

TESIS DOCTORAL

Hacia una economía circular: desarrollo de una biorrefinería de microalgas para la extracción sostenible de ficocianina y la valorización energética de la biomasa residual.

Autora:

Jennifer Sánchez Laso

Directores:

***Luis Fernando Bautista Santa Cruz
Rosalía Rodríguez Escudero***

Programa de Doctorado en Tecnologías Industriales: Química, Ambiental, Energética, Electrónica, Mecánica y de los Materiales

Escuela Internacional de Doctorado

2023

D. Luis Fernando Bautista Santa Cruz, Catedrático de Universidad en el área de Ingeniería Química del Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos,

y

Dña. Rosalía Rodríguez Escudero, Profesora Titular de Universidad en el área de Ingeniería Química del Departamento de Tecnología Química, Energética y Mecánica de la Universidad Rey Juan Carlos

Certifican:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Hacia una economía circular: desarrollo de una biorrefinería de microalgas para la extracción sostenible de ficocianina y la valorización energética de la biomasa residual” constituye la memoria que presenta Dña. Jennifer Sánchez Laso para aspirar al grado de Doctor por la Universidad Rey Juan Carlos, y que ha sido realizado en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos bajo nuestra dirección.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Móstoles, a de de 2023.

Fdo. Luis Fernando Bautista Santa Cruz

Fdo. Rosalía Rodríguez Escudero

“El éxito en la vida no se mide por lo que logras sino por los obstáculos que superas”

Laureano Gallardo

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores Fernando Bautista y Rosalía Rodríguez porque me han demostrado ser unas personas excelentes. Por la confianza depositada en mí, por valorarme incluso más de lo que a veces me valoro yo misma, por ayudarme y apoyarme tanto en lo profesional como en lo personal y por su gran paciencia y esfuerzo a lo largo de estos años. Sus conocimientos y experiencia han sido claves para que todo haya salido adelante. Quisiera también agradecer de forma especial a Gemma Vicente y a Juan José Espada por su apoyo, comprensión y dedicación porque en muchas ocasiones han sido dos directores más de mi tesis, gracias por todo. A todos los compañeros de línea que forman o han formado parte de ella: Victoria, Alejandra, Jorge W., Irene, Pilar, Noelia, Alejandro, Alba, Rubén, Carlos, Raquel, Jorge, Isa y Patri gracias a todos, me llevo una gran experiencia y he aprendido mucho de vosotros.

A Irene, porque me ha demostrado que puedo contar con ella para todo (dentro y fuera del laboratorio), por ser una gran persona, porque siempre sabe cómo animarme, y porque se ha convertido en una amiga para mí. A Pilar, porque no hace falta hablar para entender en qué momento del día estamos, por su apoyo, ayuda y por aprender siempre juntas. A Noelia, por nuestros ratitos de risas necesarias (junto con alguna palmerita), gracias por animarme cuando lo he necesitado. Gracias Silvia, por ser mi apoyo constante, por tu ayuda y paciencia cuando lo he necesitado, por todas esas horas poniendo a punto el reactor, por esos ratitos de desconexión y por todos los innumerables consejos, sin ti no habría sido posible. A Jesús, por ser compañero tanto de laboratorio como de prácticas, gracias por tus consejos y por alegrarme en muchos días duros de laboratorio. A Almu, por todos esos ratitos de medir en el Karl Fischer y por todas las risas. A todos los integrantes del Grupo de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos, gracias por vuestra ayuda cuando lo he necesitado.

A todos y cada uno de mis amigos, que, aunque debido a la pandemia nos hemos visto menos, sé que estáis ahí y me apoyáis. En especial a Marta, Luci, Angie y Roya. A Tania, que se ha convertido en una persona muy especial en mi vida.

A toda mi familia, en especial a mis padres. Sin ellos no habría sido posible, gracias por vuestro apoyo, paciencia y comprensión en los buenos y en los malos momentos. Por animarme siempre e intentar que aprenda a valorarme. Siempre puedo contar con vosotros y vosotros conmigo. Os quiero.

Por último, quiero agradecer a David, por haberme aguantado cuando no me aguantaba ni yo misma, por aprender juntos que lo verdaderamente importante en la vida es la propia vida (aunque haya sido de la peor forma), por enseñarme a priorizar y a mantener la calma (esto último

todavía lo estoy trabajando). Eres la persona que más me ha sufrido estos últimos meses y aun así has seguido ahí, gracias, haces que mi vida sea mejor a tu lado.

GRACIAS A TODOS

Publicaciones surgidas de la presente investigación

- Sánchez-Laso J, Piera A, Vicente G, Bautista LF, Rodríguez R, Espada JJ. A successful method for phycocyanin extraction from *Arthrospira platensis* using [Emim][EtSO₄] ionic liquid. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2021, 15.
- Sánchez-Laso J, Espada JJ, Rodríguez R, Vicente G, Bautista LF. A novel biorefinery approach for phycocyanin extraction and purification and biocrude production from *Arthrospira platensis*. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2023, 62.

Comunicaciones a congresos internacionales

- Espada Juan J, Piera A, Sánchez-Laso J, Bautista LF, Vicente G, Rodríguez R. Production of biofuels and bioproducts from microalgae using ionic liquid based processes. 27TH European Biomass conference & Exhibition. Portugal, **2019**. Comunicación póster.
- Sánchez-Laso J, Piera A, Espada JJ, Bautista LF, Vicente G, Rodríguez R. Phycocyanin extraction from *Arthrospira platensis* using different ionic liquids based on Aqueous Two-Phase Systems (ATPS). International Conference on Algal Biomass, Biofuels & Bioproducts. On-line, **2021**. Comunicación póster.
- Sánchez-Laso J, Espada JJ, Bautista LF, Vicente G, Rodríguez R. Combined production of phycocyanin and biocrude from *Arthrospira platensis* using ionic liquid and hydrothermal liquefaction process. 3rd International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability. On-line, **2021**. Comunicación póster.
- Sánchez-Laso J, Espada JJ, Bautista LF, Vicente G, Rodríguez R. Ionic liquid-assisted extraction of phycocyanin and biogas production from *Arthrospira platensis*. A biorefinery approach. 30TH European Biomass conference & Exhibition. On-line, **2022**. Comunicación póster.

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	8
1.1. Microalgas	8
1.1.1. Definición y características de microalgas y cianobacterias	8
1.1.2. Influencia de las condiciones de cultivo.....	12
1.2. Bioproductos	13
1.2.1. Situación actual	14
1.2.2. Compuestos de alto valor añadido en las microalgas	16
1.2.3. Factores que afectan a la producción de pigmentos en las microalgas	28
1.2.4. Importancia del color azul: Ficocianina	32
1.2.5. Métodos de extracción	37
1.2.6. Disolventes de extracción.....	39
1.2.7. Líquidos iónicos	42
1.2.7.1. Definición, características, estructura, ventajas y aplicaciones.....	42
1.2.7.2. Clasificación.....	49
1.2.7.3. Actuación del líquido iónico	50
1.2.7.4. Toxicidad y biodegradabilidad.....	52
1.2.7.5. Recuperación y reutilización de los líquidos iónicos	54
1.2.8. Separación y purificación de ficocianina	54
1.1.8.1. Métodos convencionales	55
1.2.8.2. Sistemas de dos fases acuosas (ATPS).....	58
1.3. Bioenergía	66
1.3.1. Situación energética actual.....	66
1.3.2. Biocombustibles	70
1.3.2.1. Biocombustibles a partir de microalgas	72
1.3.3. Licuefacción hidrotérmica de microalgas	83
1.3.3.1. Productos obtenidos	84
1.3.3.2. Mecanismo de reacción.....	86
1.3.3.3. Factores que afectan al proceso HTL.....	88
1.3.3.4. HTL de residuos de microalgas.....	90
1.3.3.5. Uso de cosolventes	90
1.3.4. Producción de biogás a partir de microalgas.....	92
1.3.4.1. Productos que se obtienen y etapas del proceso.....	93
1.3.4.2. Factores que afectan al proceso.....	94

1.3.4.3. Digestión anaerobia de residuos de microalgas.....	97
1.3.4.4. Uso de cosustratos.....	98
1.4. Concepto de biorrefinería. Contexto de la tesis doctoral	98
1.4.1. Análisis de ciclo de vida.....	102
2. Objetivos	105
3. Metodología	107
3.1. Etapas del proceso.....	107
3.1.1. Extracción de ficocianina	107
3.1.2. Separación y purificación de ficocianina	110
3.1.3. Licuefacción hidrotérmica (HTL)	121
3.1.4. Producción de biogás	122
3.2. Métodos de análisis	124
3.2.1. Caracterización de la microalga de partida y de la biomasa residual	124
3.2.2. Determinación de ficobiliproteínas	125
3.2.3. Separación y Purificación de ficocianina	126
3.2.4. Análisis de los productos del proceso de HTL.....	127
3.2.5. Análisis de la producción de biogás.....	127
3.2.5.1. Determinación del potencial bioquímico de metano	128
3.2.5.2. Análisis iniciales y finales.....	129
3.3. Biorrefinerías propuestas. Contexto de la tesis doctoral	131
3.4. Simulación y optimización.....	132
3.5. Análisis del ciclo de vida de los procesos (ACV).....	136
4. Resultados y discusión	139
4.1. Caracterización de <i>Arthrospira platensis</i>	139
4.2. Extracción de ficocianina. Diseño de experimentos.	139
4.2.1. Análisis estadístico.....	140
4.2.3. Influencia de las condiciones de operación sobre la extracción de ficocianina	145
4.2.4. Superficies de respuesta	147
4.2.5. Condiciones óptimas para la extracción de ficocianina	150
4.2.6. Comparativa con otros trabajos anteriores	151
4.2.7. Proceso de extracción con otros líquidos iónicos.....	151
4.3. Recuperación y reutilización del líquido iónico.....	152
4.4. Sistemas de dos fases acuosas (ATPS)	154
4.4.1. Estudio del efecto del pH	159
4.4.2. Estudio del efecto del catión del líquido iónico	161
4.5. Purificación de ficocianina.....	170

4.5.1. Método de purificación 1: diálisis + precipitación	170
4.5.2. Método de purificación 2: ATPS + diálisis + precipitación	172
4.5.2.1 ATPS con LI recuperado.....	178
4.5.3. Electroforesis.....	183
4.6. Aprovechamiento de la biomasa residual.....	187
4.6.1. Caracterización de la biomasa residual	187
4.6.2. Proceso de HTL.....	188
4.6.3. Digestión anaerobia.....	202
4.7. Análisis del ciclo de vida de los procesos	210
4.7.1. Definición del objetivo y alcance	210
4.7.2. Análisis de inventario.....	210
4.7.3. Evaluación de impactos.....	230
4.7.3.1. Cultivo, extracción y purificación de ficocianina.....	232
4.7.3.2. Aprovechamiento de la biomasa residual. HTL frente a Biogás.....	235
5. Conclusiones	240
5.1 Recomendaciones futuras.....	243
6. Bibliografía	245

Resumen de Abreviaturas

ACV: Análisis de ciclo de vida

AGV: Ácidos grasos volátiles

AIL: Líquidos iónicos apróticos

ALA: Alanina

AP o *A. platensis*: *Arthrospira platensis*

APC: Aloficocianina

ARG: Arginina

ASN: Asparagina

ASP: Ácido aspártico

ATP: Adenosín trifosfato

ATP-FTIR: Reflectancia total atenuada

ATPS: Sistema de dos fases acuosas

BMP: Potencial bioquímico de metano

BMR: Biomasa residual

Bs: Base seca

BSA: Albúmina de suero bovino

CED: Demanda de energía acumulada

COP: Conferencia de las partes

CYS: Cisteína

DA: Digestión anaerobia

DDA: Dosis diaria aceptable

DHA: Ácido docosahexaenoico

HTL: Licuefacción hidrotérmica

ICV: Inventario del ciclo de vida

ILE: Isoleucina

IPCC: Panel intergubernamental sobre el cambio climático

LEU: Leucina

LI: Líquido iónico

LYS: Lisina

MET: Metionina

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NER: Relación de energía neta

OMS: Organización mundial de la salud

ONU: Organización de las Naciones Unidas

PC: Ficocianina

PCB: Ficocianobilina

PE: Ficoeritrina

PEB: Ficoeritrobilina

PEG: Polietilenglicol

PF: Factor de purificación

PHE: Fenilalanina

PIL: Líquidos iónicos próticos

PRO: Prolina

PUB: Ficourobilina

DQO: Demanda química de oxígeno

EDAR: Estación depuradora de aguas residuales

EPA: Ácido eicosapentaenoico

ER: Energía recuperada

FAO: La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Administración de alimentos y medicamentos

FID: Detector de ionización de llama

GEI: Gases de efecto invernadero

GLN: Glutamina

GLU: Ácido glutámico

GLY: Glicina

HHV: Poder calorífico superior

HIS: Histidina

HTC: Carbonización hidrotermal

HTG: Gasificación hidrotermal

PUFA's: Ácidos grasos poliinsaturados

PVB: Ficoviolobilina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SER: Serina

STD-NMR: Espectroscopía RMN de Diferencia de transferencia de Saturación

TCD: Detector de conductividad térmica

THR: Treonina

TLs: Tie- lines

TRP: Triptófano

TYR: Tirosina

UE: Unión Europea

US o UAE: Ultrasonidos o extracción asistida por ultrasonidos

VAL: Valina

RESUMEN

Resumen

Las microalgas y cianobacterias, aparte de ser consideradas fuentes de energía renovables para la obtención de biocombustibles, también son materias primas muy importantes ya que en su interior acumulan numerosos compuestos de alto valor añadido, con grandes aplicaciones en diferentes sectores industriales. Entre los bioproductos que pueden almacenar se encuentran los pigmentos naturales (clorofilas, ficobiliproteínas, y carotenoides), la astaxantina, el ácido docosahexaenoico, lípidos, proteínas, vitaminas, etc. La presente tesis doctoral se ha centrado en la extracción, separación y purificación de uno de los pigmentos naturales, la ficocianina. Se considera una de las ficobiliproteínas más importantes debido a su capacidad antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria y neuroprotectora, entre otras. Es de color azul y está presente principalmente en las cianobacterias, concretamente en *Arthrospira platensis*, por ello, esta fue la cianobacteria seleccionada en el presente trabajo.

Los pigmentos naturales extraídos de plantas, animales y minerales se han utilizado durante muchos años como colorantes naturales. Sin embargo, en el siglo XIX surgen los colorantes sintéticos como sustitutos a los colorantes naturales y han sido utilizados durante muchos años, por sus interesantes propiedades. Sin embargo, numerosas investigaciones señalan que el uso de colorantes sintéticos ha de reducirse ya que algunos de ellos han demostrado ser un peligro para la salud humana. Por el contrario, se ha demostrado que algunos colorantes naturales, entre ellos los carotenoides y las ficobiliproteínas, presentes en las microalgas y cianobacterias, presentan efectos preventivos para algunas enfermedades como la diabetes, la obesidad y enfermedades cardiovasculares. Esta naciente conciencia tanto de los efectos nocivos de los colorantes sintéticos como de los efectos preventivos de los colorantes naturales, unido a la reciente inclinación de la sociedad por el uso de productos más naturales ha llevado al aumento de la demanda de ciertos bioproductos (*β -caroteno*, *espirulina*) en alimentación y cosmética y, con ello a la utilización de las microalgas y cianobacterias como fuentes naturales.

Las microalgas son una fuente muy interesante de colorantes naturales desde el punto de vista biotecnológico y medioambiental ya que poseen una amplia gama de pigmentos, crecen rápidamente en comparación con plantas superiores, pueden contener pigmentos en concentraciones considerablemente mayores a las que se encuentran en dichas plantas superiores, consumen CO₂ durante su cultivo y tienen facilidad en su cultivo ya que a menudo pueden crecer en ambientes marinos. Asimismo, como estos microorganismos no requieren de tierra fértil para su cultivo, se evita la competitividad con la industria alimentaria.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es la integración, tanto del proceso de extracción de un compuesto de alto valor añadido (como es la ficocianina), como del proceso de valorización energética de la biomasa residual obtenida tras dicha extracción, en un esquema de

RESUMEN

biorrefinería. Por ello, la combinación de la extracción de ficocianina junto con la producción de biocombustibles resulta imprescindible para que el proceso sea tanto económica como energéticamente viable en el marco de una economía circular. En el proceso global se produce una mezcla de productos, los de alto valor añadido (ficocianina) son los responsables de la viabilidad económica del proceso mientras que el resto de compuestos son los que pueden suministrar o minimizar la demanda energética del sistema.

El valor económico que presenta la ficocianina viene condicionado por su grado de pureza, variando su precio desde 0,13 \$/mg cuando la pureza es de grado alimenticio hasta alcanzar valores de 33 \$/mg cuando se alcanza el grado analítico. Por ese motivo, aparte de ser necesaria la extracción de este bioproducto, también es necesaria su separación y purificación, siendo otro de los objetivos de la presente tesis doctoral. Sin embargo, a pesar de su alto valor económico, su comercialización todavía continúa en desarrollo, debido a los altos costes de extracción, separación y purificación. Por ello, han surgido los líquidos iónicos (LIs) como disolventes alternativos ya que se ha comprobado que pueden ser reutilizados, lo que mejora la economía del proceso. De igual forma, su baja volatilidad hace que también sean medioambientalmente viables.

En la presente tesis doctoral, en primer lugar, se analizaron las condiciones óptimas para maximizar la cantidad de ficocianina extraída mediante el pretratamiento de la biomasa de *Arthrospira platensis* con líquidos iónicos y ultrasonidos. Para ello se planteó un diseño factorial de experimentos del tipo compuesto central en el que se evaluaron los siguientes factores: la relación en masa de líquido iónico/agua y de biomasa/disolvente, la potencia y el tiempo de ultrasonidos.

Por otro lado, se estudió el proceso de separación y purificación de ficocianina a partir del extracto crudo de ficocianina obtenido anteriormente mediante distintos procesos: sistemas de dos fases acuosas (sistemas ATPS), diálisis y precipitación con sulfato de amonio. En esta etapa de purificación surgieron dos enfoques; el primero de ellos basado en la etapa de diálisis y la posterior precipitación con sulfato de amonio y el segundo enfoque contenía la etapa adicional de separación mediante sistemas ATPS seguido de la diálisis y la precipitación.

En el caso particular del presente trabajo, se plantearon dos biorrefinerías con el fin de evaluar las diferentes posibilidades de integración energética de la biomasa residual resultante del proceso de extracción de ficocianina. Este aprovechamiento energético se ha evaluado mediante licuefacción hidrotérmica (HTL) (biorrefinería 1) y digestión anaerobia (biorrefinería 2). Ambas biorrefinerías propuestas parten de la misma biomasa residual.

En el caso de la biorrefinería 1, se ha optimizado la producción de bioaceite a partir de la biomasa residual húmeda generada tras el proceso de extracción de ficocianina mediante el

proceso de HTL no catalítico en reactores de acero discontinuos. El proceso se estudió a 300 y 350°C y se analizó el efecto de la adición de distintos cosolventes (metanol, etanol e isopropanol) tanto para la biomasa completa como para la biomasa residual, para mejorar el rendimiento al bioaceite y la calidad del mismo.

En el caso de la biorrefinería 2, se analizó la producción de metano a partir de la misma biomasa residual, tanto en condiciones mesofílicas como termofílicas. Generalmente las cianobacterias y, concretamente *Arthrospira platensis*, presentan una baja relación C/N, debida a su alto contenido en nitrógeno. Por ello, con el fin de mejorar esa relación y la producción de biogás, se adicionó glicerol como cosustrato.

Para finalizar, se ha realizado la evaluación medioambiental de ambas biorrefinerías a partir de los resultados experimentales obtenidos en cada uno de los procesos planteados. Para llevar esto a cabo, se han realizado las simulaciones de ambas biorrefinerías teniendo en cuenta el alcance de estudio, es decir, el objetivo, la unidad funcional y los límites del sistema. Ambos esquemas de simulación se realizaron empleando el software comercial SuperPro Designer 9.5. Una vez que se han elaborado y analizado los inventarios obtenidos mediante la simulación se procedió a evaluar tanto cualitativa como cuantitativamente los impactos ambientales asociados al proceso, empleando el programa SimaPro 7.2.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la presente tesis doctoral se ha dividido en cuatro grandes bloques cuyos resultados y principales conclusiones se recogen a continuación.

Extracción de ficocianina

En primer lugar, se ha seleccionado el líquido iónico con el que se llevarán a cabo las extracciones de ficocianina: el [EMIM][EtSO₄], ya que es el más adecuado para romper la pared celular de las cianobacterias. Se realizaron los ensayos planteados en el diseño de experimentos para determinar las condiciones adecuadas y maximizar la cantidad de ficocianina extraída. Según el análisis estadístico y el estudio de la influencia de las condiciones de extracción, los factores más significativos para la cantidad de ficocianina extraída fueron la relación líquido iónico/agua y el tiempo de ultrasonicación. Y, por último, se pudieron conocer las condiciones óptimas para maximizar la cantidad de ficocianina extraída que fueron 0,18 g de *Arthrospira platensis* mezclados con 10 mL de una disolución de líquido iónico al 20,86% p/p, junto con el pretratamiento con ultrasonidos a una potencia del 80% y durante 25 minutos. El experimento de extracción en condiciones óptimas se llevó a cabo por triplicado y se obtuvo un valor experimental de $76,6 \pm 0,4$ mg/g (E_{PC}), que coincidió con el valor predicho por el modelo matemático obtenido del diseño factorial de experimentos 75,9 mg/g (E_{PC}).

Por otro lado, se realizó un estudio comparativo con otros trabajos previos que utilizaban

RESUMEN

otros líquidos iónicos como el acetato de 2-hidroxiethylamonio (2-HEAA), formiato de 2-hidroxiethylamonio (2-HEAF), y su mezcla (2-HEAA+2-HEAF). Y se demostró que el [EMIM][EtSO₄] fue el líquido iónico con mayor capacidad para romper la pared celular de las cianobacterias y extraer así la ficocianina. Este resultado también se comparó con otros líquidos iónicos que han sido publicados previamente como grandes disruptores tanto en la extracción de lípidos: [BMIM][MetSO₄] como de ficobiliproteínas: [BMIM][Cl]. Dicho proceso de extracción se realizó empleando las condiciones óptimas de extracción de ficocianina obtenidas tras el diseño de experimentos. Como conclusión, el [EMIM][EtSO₄] fue el líquido iónico que extrajo mayor cantidad de ficocianina, en comparación con los otros LIs.

Así mismo, se evaluó la recuperación del líquido iónico seleccionado y su capacidad de reutilización en posteriores extracciones de ficocianina. Se concluyó que dicho líquido iónico se puede reutilizar con éxito durante 7 ciclos de extracción y que su capacidad de extracción solo se vio disminuida en un 21%.

Separación y purificación de ficocianina

En esta etapa, en primer lugar, se construyeron las curvas de equilibrio necesarias para poder llevar a cabo la separación de la ficocianina mediante sistemas ATPS. Se construyó una curva para cada líquido iónico usado y la correspondiente sal K₂HPO₄ en el sistema ATPS. Los LIs fueron los siguientes: [EMIM][EtSO₄], [BMIM][Cl], [BMIM][MeSO₄], [BMIM][EtSO₄], [HMIM][EtSO₄], [OMIM][EtSO₄]. Para los tres primeros líquidos iónicos, se realizó un estudio de pH y se llegó a la conclusión de que el sistema ATPS ha de ser ajustado a un pH entre 6,5-7 que es el rango en el que la ficocianina es más estable.

Se analizó tanto la recuperación como la pureza de la PC para los sistemas ATPS formados por los LIs siguientes: [EMIM][EtSO₄], [BMIM][Cl] y [BMIM][MeSO₄]. Se obtuvieron las mayores recuperaciones de ficocianina en la fase superior para el [EMIM][EtSO₄] y el [BMIM][Cl] del 98,96% y del del 95,64%, respectivamente y purezas de 0,57 y 0,28, respectivamente. Por lo que también se eligió el [EMIM][EtSO₄] para la separación de ficocianina mediante ATPS.

Por este motivo, se analizó el efecto de la cadena alquílica del catión del líquido iónico [EMIM][EtSO₄], tanto en la recuperación como en la pureza de ficocianina en el sistema ATPS. Esto se realizó estudiando los siguientes líquidos iónicos: [BMIM][EtSO₄], [HMIM][EtSO₄] y [OMIM][EtSO₄] y se obtuvieron resultados tanto de recuperación de ficocianina (11,79-22,53%) como de pureza mucho menores que para el [EMIM][EtSO₄]. Por lo que se pudo concluir que las interacciones hidrofóbicas entre los residuos de aminoácidos en la superficie externa de la ficocianina y las cadenas alquílicas del catión del líquido iónico son mucho mayores para los líquidos iónicos de cadena alquílica más larga (más hidrofóbicos) que los líquidos iónicos de

RESUMEN

cadena alquílica corta y por tanto tienen un mayor efecto desestabilizador en las proteínas. Todo ello repercute de forma negativa tanto en la recuperación de la ficocianina en la fase superior del sistema ATPS como en su pureza. Por ello, se puede concluir que el [EMIM][EtSO₄] fue el LI con el que se obtienen mejores resultados tanto en la extracción como en la recuperación y pureza de ficocianina en el sistema ATPS con respecto a otros LIs de estudio.

Con respecto a las dos vías de purificación estudiadas: (1) diálisis + precipitación con sulfato de amonio y (2) sistema de bifásico acuoso (ATPS) + diálisis + precipitación con sulfato de amonio, cabe destacar que se obtuvieron purezas de ficocianina de grado reactivo ($3,5 \pm 0,1$) y de grado analítico ($4,22 \pm 0,05$), respectivamente. Por lo tanto, el método elegido para la purificación de ficocianina fue el que incorporaba la etapa de separación mediante un sistema ATPS (2).

Aprovechamiento de la biomasa residual

Como ya se ha mencionado, se plantearon dos biorrefinerías con el fin de evaluar las diferentes posibilidades de integración energética de la biomasa residual resultante del proceso de extracción de ficocianina. En la biorrefinería 1 este aprovechamiento energético se ha evaluado mediante licuefacción hidrotérmica (HTL) mientras que en la biorrefinería 2 se lleva a cabo la digestión anaerobia.

En el estudio del aprovechamiento de la biomasa residual, generada tras el proceso de extracción de ficocianina, mediante el proceso de HTL, en presencia de alcoholes como cosolventes, tanto a 300°C como a 350°C el rendimiento a bioaceite aumentó con respecto a usar agua como disolvente. El efecto combinado del aumento de la temperatura (de 300°C a 350°C) junto con la adición de isopropanol produjo rendimientos a bioaceite de $54,9 \pm 1,1\%$ p/p, bs. Lo que implica un incremento en el rendimiento a bioaceite de un 17% en comparación de utilizar agua a la misma temperatura. Cabe destacar que fue el efecto combinado de temperaturas más elevadas junto con el uso de isopropanol lo que produjo mayores rendimientos a bioaceite ya que a 300°C utilizando el mismo cosolvente, los rendimientos a bioaceite no fueron tan elevados ($22,1 \pm 1,1\%$ p/p, bs).

Las relaciones O/C de los bioaceites obtenidos a partir de la biomasa residual fueron inferiores con respecto a las relaciones O/C de los bioaceites obtenidos a partir de la biomasa completa. Por otra parte, el poder calorífico del bioaceite obtenido a partir de la biomasa residual en las condiciones óptimas (a 350°C y en presencia de isopropanol) fue de $39,7 \pm 0,2$ MJ/kg, muy próximo al del petróleo.

Por tanto, al igual que en el proceso de HTL de las microalgas completas, sería necesario añadir un paso posterior de hidrotatamiento para mejorar la calidad del bioaceite.

RESUMEN

Con respecto a la segunda opción planteada para revalorizar la biomasa residual mediante el proceso de digestión anaerobia, se estudió el proceso tanto en condiciones mesofílicas como termofílicas. Tanto la biomasa completa como la biomasa residual tienen relaciones C/N muy bajas con respecto a la relación óptima necesaria para llevar a cabo la digestión anaerobia (15-30) y que no se produzca la falla del proceso, por ello, se estudió la adición de glicerol como cosustrato.

En los experimentos llevados a cabo en condiciones mesofílicas con la biomasa residual, se ha comprobado que la adición de glicerol supuso una mejora en la producción de metano de un 11% con respecto a utilizar la biomasa húmeda sin cosustrato. Se han obtenido valores de potencial bioquímico de metano (BMP) a partir de la biomasa residual húmeda con cosustrato de 300 mL CH₄/gSV muy próximos a los que se han obtenido a partir de la biomasa completa 322 mL CH₄/gSV, sin cosustrato. Esto fue un resultado prometedor ya que con una biomasa que podría ser considerada como “residuo” se produjo prácticamente la misma producción de metano que con la biomasa de *Arthrospira platensis* completa.

Por otro lado, la digestión anaerobia llevada a cabo en condiciones termofílicas no resultó ventajosa ni para la biomasa completa ni para la residual puesto que las altas temperaturas estuvieron asociadas con altos niveles de amoníaco para el caso de la biomasa completa y con altos niveles de ácidos grasos volátiles para la biomasa residual, lo que produjo la falla del proceso de biodegradabilidad y la inhibición de los metanógenos por parte de estos compuestos.

Análisis del ciclo de vida del proceso

En primer lugar, como ambas biorrefinerías son muy extensas, se realizó el análisis del inventario analizando las diversas etapas de la simulación: cultivo, secado/liofilización, extracción de ficocianina, purificación de ficocianina y aprovechamiento de la biomasa residual.

El consumo de energía viene condicionado por la etapa de cultivo, concretamente la etapa de secado/liofilización (116,62 kWh) y por la etapa del proceso de HTL (42,92 kWh). Una vez que se tuvieron las tablas de los inventarios de ciclo de vida, dentro de la metodología CML 2001, se seleccionaron las categorías de impacto siguientes: agotamiento de recursos abióticos, acidificación, eutrofización, cambio climático, toxicidad humana y ecotoxicidad terrestre.

A continuación, se procedió a realizar la cuantificación de los impactos ambientales seleccionados empleando el software SimaPro 7.2, tanto para la extracción y purificación de ficocianina como para el aprovechamiento de la biomasa residual.

Se puede destacar que la etapa de secado fue la que más influyó, con diferencia, en casi todas las categorías de impacto con contribuciones desde el 40%, para el caso de la ecotoxicidad terrestre, hasta el 80%, para el caso de la demanda de energía acumulada y agotamiento de

RESUMEN

recursos abióticos. Con respecto a esta última, el agotamiento de recursos abióticos, la contribución de casi el 80% se debe a que la mayor parte de electricidad que se consume en la etapa de secado (según el mix eléctrico español utilizado como base de datos en el programa SimaPro 7.2) se basa en el consumo de la reserva de los combustibles (carbón, petróleo, gas natural, etc.) para producir energía.

Analizando los resultados en torno a la etapa de extracción de ficocianina, se puede determinar que esta etapa no resultó muy contaminante en ninguna categoría ya que contribuyó entre un 3-8%. Dicha contribución se debió al uso en esta etapa del LI y del ultrasonidos.

Cabe destacar que las dos etapas de la purificación de ficocianina (diálisis y precipitación) han generado un impacto mucho menor puesto que tuvieron contribuciones de entre un 1% y un 3%. Esta contribución tan baja en todas las categorías fue debida a que en ambas etapas se requirieron pocos recursos, tanto materiales como energéticos.

Por último, se compararon los impactos ambientales asociados al proceso de HTL y al de digestión anaerobia y se concluyó que la producción de bioaceite mediante HTL generaba un impacto mucho mayor en todas las categorías que la producción de biogás mediante digestión anaerobia (10-30%). Por lo tanto, el esquema de biorrefinería que resultó medioambientalmente más viable fue el esquema de biorrefinería 2.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Microalgas

1.1.1. Definición y características de microalgas y cianobacterias

Las microalgas son microorganismos eucariotas fotosintéticos y pueden servir como materias primas para la obtención de productos de alto valor añadido. Fijan CO₂ y producen O₂ (aproximadamente el 50% del oxígeno presente en la atmósfera) y biomasa rica en nutrientes, en presencia de la luz solar, mediante la fotosíntesis [1,2].

De acuerdo con el registro fósil más antiguo estudiado en Australia Occidental, estos microorganismos se originaron hace 3.400 millones de años, y pertenecían al grupo de cianobacterias. Los biólogos evolutivos estiman que las microalgas podrían ser los ancestros de las plantas, de forma que, con el tiempo, dieron origen a otras plantas marinas y éstas se trasladaron a la tierra durante la era Paleozoica hace 450 millones de años, como también sucedió con los animales [3]. Pueden crecer tanto en agua dulce como en agua marina, así como en prácticamente todas las condiciones ambientales del planeta; tanto en tierras heladas de Escandinavia hasta los desiertos del Sáhara. Son una fuente prometedora de energía y de bioproductos debido a su rápida tasa de crecimiento y su capacidad para acumular lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Con respecto a su crecimiento y cultivo, tienen la ventaja de que no compiten con terrenos agrícolas, evitando así conflictos con la industria alimentaria [3,4].

Como son organismos muy pequeños, unicelulares, los biólogos también las denominan fitoplancton. Las microalgas tienen un diámetro de entre 1 y 50 micrómetros y generalmente viven en sistemas de agua como arroyos, ríos, lagos y océanos. En estos últimos cabe destacar que son el primer eslabón en la cadena alimentaria oceánica. Hasta la fecha se han descrito más de 50.000 especies de microalgas conocidas, las cuales se pueden clasificar según su ultraestructura, composición bioquímica, pigmentos y ciclo de vida [2,5].

Atendiendo a su tamaño, las microalgas se pueden clasificar en picoplancton (0,2-2 µm), ultraplancton (0,5-15 µm), nanoplancton (2-100 µm) y microplancton (20-1000 µm) [2]. Las tres clases más importantes de las microalgas en base a su abundancia son las diatomeas (Bacillariophyceae), algas verdes (Chlorophyceae) y algas doradas (Chrysophyceae) [6].

Tanto el crecimiento de las microalgas como la producción de metabolitos primarios y secundarios están ligados a las variaciones de temperatura, luz, pH, salinidad y disponibilidad de nutrientes. Los metabolitos primarios son aquellos que se producen como resultado de los procesos de crecimiento, reproducción, división celular o del propio metabolismo energético de

INTRODUCCIÓN

las microalgas. Se incluyen, por ejemplo, la producción de lípidos como los ácidos grasos poliinsaturados, antioxidantes como los carotenoides y algunos tipos de proteínas. Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos que no son utilizados por las microalgas para sus necesidades primarias e incluyen compuestos que actúan como hormonas, antibióticos o toxinas. La producción de estos metabolitos es característica de cada especie y cepa, y está asociada a la exposición del microorganismo a condiciones ambientales específicas, causadas, por ejemplo, por factores de estrés [7].

Por otro lado, las cianobacterias también conocidas como algas verdes-azules son organismos procariotas gramnegativos que evolucionaron hace 3.600 millones de años, con lo que son más antiguas que las microalgas. Son organismos acuáticos y fotoautótrofos capaces de convertir nutrientes inorgánicos, como el dióxido de carbono, nitratos, fosfatos y microelementos, en biomasa y en una gran variedad de metabolitos. Las células de las cianobacterias tienen forma esférica, de varilla o espiral y pueden ser unicelulares, formar colonias o filamentos y, algunas especies, también pueden formar biopelículas [8]. Pueden adaptarse a un entorno cambiante, modificando su morfología y diferenciándose en células especializadas. Fueron designadas durante mucho tiempo como algas cianófitas o cianofíceas. Cuando se descubrió la distinción entre la célula procariota y eucariota, se pudo comprobar que éstas eran las únicas “algas” procariotas y, por ello, el término *cyanobacteria*, comenzó a tener protagonismo.

Actualmente, las cianobacterias, junto con las microalgas, se han convertido en microorganismos muy estudiados ya que acumulan en su interior productos naturales bioactivos con múltiples aplicaciones [1,9]. Las cianobacterias producen alrededor de 1100 metabolitos secundarios, incluidos los péptidos, policétidos, terpenos, carotenoides, alcaloides y lípidos con un alto potencial terapéutico con propiedades antivirales, antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas [8].

Existen distinciones obvias entre las cianobacterias y las microalgas. En primer lugar, la presencia de estructuras unidas a la membrana en las células eucariotas, que se adquirieron durante la evolución. En segundo lugar, las eucariotas son más grandes, más complejas, más diversas, y pueden ser unicelulares o multicelulares; mientras que las procariotas son más simples y son organismos unicelulares que no tienen un núcleo definido con una membrana ni otros orgánulos específicos (figuras 1 y 2).

En muchas ocasiones la estructura resistente de la pared celular de algunas especies de microalgas actúa como un factor limitante para la explotación industrial de dichas microalgas [10]. Esta pared celular es una estructura rígida que encapsula completamente el citoplasma y permite a la célula que aumente su presión de turgencia, sin estallar. La composición de la pared celular depende de la especie y puede utilizarse como marca identificadora, por su taxonomía

INTRODUCCIÓN

[11]. Las paredes celulares de las microalgas consisten principalmente en una capa celular interna y una capa celular externa y se pueden agrupar en tres tipos: (1) con una capa externa trilaminar, (2) con una monocapa externa delgada y (3) sin capa externa [12]. La capa externa, aunque varía según cada especie, generalmente contiene polisacáridos específicos, como pectina, agar y alginato. La capa interna de la pared celular de las microalgas se compone principalmente de celulosa y otros materiales como hemicelulosa y glicoproteínas [13] mientras que en las cianobacterias la pared celular es de peptidoglicano, a menudo con capas o fibrillas asociadas y es una fuente rica en proteínas.

Debido a esta fuente de proteínas y al contener también otros productos de interés como aminoácidos esenciales, carbohidratos, lípidos, pigmentos, ácidos nucleicos, vitaminas y minerales, entre otros, hoy en día la biomasa de microalgas, principalmente de los géneros *Chlorella* y *Arthrospira* (espirulina), se comercializa como alimento saludable y como fuente de proteínas en forma de tabletas, cápsulas y líquidos [14].

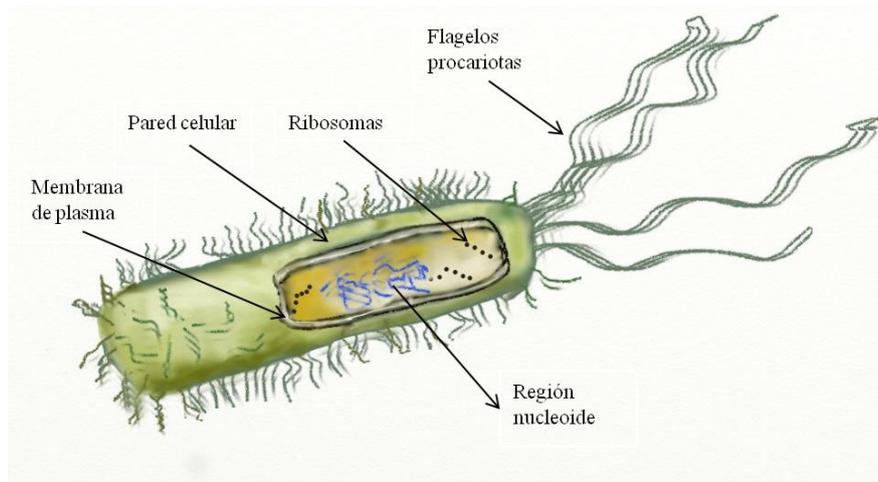


Figura 1. Esquema de la organización de una célula procariota. Elaboración propia.

INTRODUCCIÓN

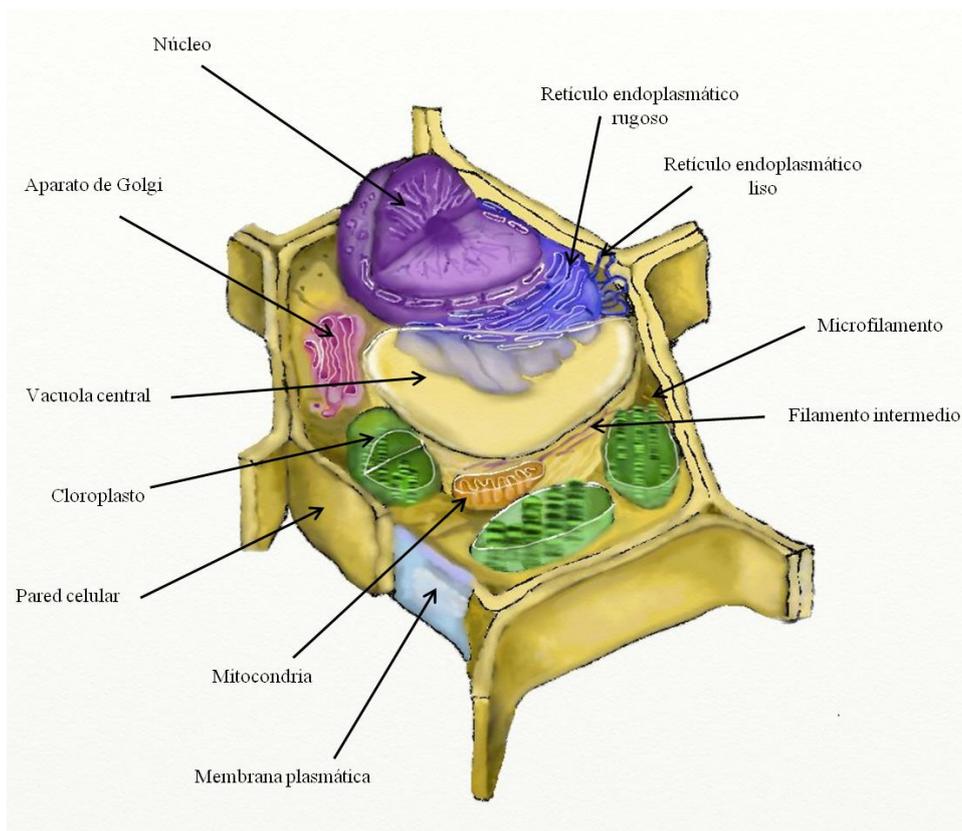


Figura 2. Esquema de la organización de una célula eucariota. Elaboración propia.

Tanto las microalgas como las cianobacterias se encuentran regularmente en todas las masas de agua, bajo el hielo en las áreas polares, en tierras áridas del desierto o incluso, en simbiosis con otros animales [7,15]. La diversidad de las microalgas y cianobacterias es inmensa, con especies, géneros e incluso clases que se descubren cada año. Se han descrito unas 50.000 especies de la cifra de millones que se estiman; pero, hoy en día, no más de una docena se cultivan y explotan de forma regular a gran escala para fines biotecnológicos y propósitos comerciales.

Durante décadas, la biomasa de cianobacterias y microalgas ha sido utilizada para la producción de biocombustibles [16], e incluso para el tratamiento de aguas residuales [17,18]. Recientemente, ha despertado un gran interés debido a que se puede aprovechar en la producción de una gran variedad de compuestos de alto valor añadido. En este caso, estos bioproductos pueden ser utilizados en la industria como colorantes alimenticios [19], compuestos con aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética [20], así como antioxidantes y otros productos con aplicación en la industria alimentaria y nutracéutica [21]. La investigación de cómo las condiciones de cultivo pueden afectar a la producción de estos compuestos bioactivos sigue siendo hoy en día muy escasa. Algunos autores como Spoehr y Milner (1948) [22] mostraron que la manipulación de las condiciones en las que crecen tanto las microalgas como las cianobacterias pueden promover la producción de biomasa con valiosos metabolitos secundarios. En la mayoría de los casos en los que se quiere aumentar la producción de productos de alto valor añadido se

hace en dos etapas. En el primer paso, los microorganismos se cultivan en condiciones óptimas para maximizar la producción de biomasa. En el segundo paso se busca inducir la producción de compuestos bioactivos de forma que se somete el cultivo a ciertas condiciones de estrés, como pueden ser una alta intensidad de luz o la privación de algunos nutrientes.

1.1.2. Influencia de las condiciones de cultivo

Una vez descritas las microalgas y cianobacterias, es necesario considerar los componentes más importantes para su cultivo. Aparte de necesitar los nutrientes, en el cultivo se han de tener en cuenta otros factores como son la estabilización del pH, el control de la temperatura, la prevención de contaminantes, etc. De igual forma, los cambios en los factores abióticos del cultivo (alteración de nutrientes, temperatura, salinidad, pH, fotoperíodo, intensidad de la luz, etc.) afectan a la composición bioquímica de las microalgas [23,24]. Como consecuencia, se pueden adaptar los cultivos para fines específicos a través de modificaciones en las condiciones de cultivo.

❖ Fotoperiodo

Como son organismos fotosintéticos, la luz es uno de los factores más importantes en el cultivo, tanto de microalgas como de cianobacterias. La variación del fotoperíodo y de la intensidad lumínica pueden afectar tanto a la producción de biomasa como a la composición bioquímica de las microalgas, concretamente, aumentando la producción de biomasa y de lípidos con su incremento [25]. En los ciclos de luz-oscuridad, de forma general, la luz favorece la acumulación de carbohidratos y, de esta forma, en la fase de oscuridad se metabolizan y esta energía se utiliza para sintetizar proteínas [26].

Aunque no todas las especies de microalgas responden igual a los cambios en los ciclos de luz-oscuridad, la gran mayoría aumenta su crecimiento con el incremento de horas de luz, y se favorece la producción de biomasa con el incremento en la intensidad de ésta, como es el caso de la cianobacteria *Arthrospira platensis* [27], especie estudiada en la presente tesis doctoral.

Además del fotoperiodo, la intensidad de la luz es uno de los factores limitantes en el crecimiento de las microalgas. Su incremento, de forma general, conduce a una mayor producción de biomasa y de lípidos. De igual forma, para la cianobacteria de estudio, a mayor intensidad de luz, más rápido se produce el crecimiento. Sin embargo, a niveles de intensidad de luz por encima de $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ se puede producir estrés oxidativo y fotoinhibición [28,29].

❖ Nitrógeno

El nitrógeno es el constituyente principal de las proteínas en las microalgas. Habitualmente, se añade al medio de cultivo en forma de nitratos, amonio o urea (o una combinación de ellos).

Normalmente, las sales NaNO_3 y KNO_3 son las dos fuentes de nitrógeno que conducen a una mayor producción de biomasa [30]. De forma general, un exceso de este elemento conduce a un aumento en la acumulación de proteínas, y a la disminución en la producción de carbohidratos. Se ha comprobado que, utilizando urea como fuente de nitrógeno en el cultivo de *A. platensis*, se produce un mayor crecimiento que utilizando KNO_3 , dando lugar así, a una mayor producción de biomasa [31].

❖ Adición de CO_2

Las emisiones directas de CO_2 son la principal fuente antropogénica que contribuyen al calentamiento global. Por ello, estos últimos años se han propuesto varias estrategias para disminuir el CO_2 atmosférico. Una de las formas es la reducción de CO_2 a carbono orgánico a partir de la fijación por las microalgas [32]. De forma general, las microalgas se han cultivado en sistemas aireados, donde las microalgas capturan únicamente el CO_2 contenido en el aire. Para la mayoría de microalgas, la adición de CO_2 incrementa la productividad de la biomasa, junto con la de lípidos [32].

❖ Otras variables

Aparte del nitrógeno, hay otros nutrientes que afectan al crecimiento y a la composición bioquímica de las microalgas, como puede ser el fósforo. Al igual que con el nitrógeno, se ha observado que reducir la concentración de fósforo implica un incremento en el contenido lipídico de las microalgas. Generalmente, la reducción de cualquier nutriente principal provoca el incremento del contenido lipídico [33].

Específicamente, la cianobacteria *A. platensis* suele cultivarse en el medio Zarrouk y el crecimiento óptimo se produce en un intervalo de pH de 8,5-10,5 [31]. Sin embargo, no solo los factores nutricionales son los responsables del desarrollo y crecimiento de estos microorganismos, sino que también se deben valorar los factores fisicoquímicos. La temperatura es un factor a tener en cuenta a la hora de evaluar el crecimiento de las microalgas [34]. Las altas y bajas temperaturas pueden provocar cambios en las tasas de crecimiento y en la acumulación de lípidos. Por ejemplo, para la cianobacteria de estudio, la temperatura de crecimiento óptima está entre 25 y 35°C [31].

1.2. Bioproductos

En las últimas décadas se ha prestado una mayor atención a la posibilidad de cultivar microalgas y cianobacterias con fines comerciales. Actualmente, los pigmentos de las microalgas tienen una alta demanda en el mercado de la alimentación, como potenciadores renovables de colores naturales para alimentos y piensos; en la industria farmacéutica, como indicadores basados en fluorescencia y/o trazadores bioquímicos en inmunoensayos; y en la industria cosmética, para cremas para la piel que estimulan la síntesis de colágeno. Esto, unido a su alta

disponibilidad en el ecosistema acuático, hace que tengan el potencial suficiente para convertirse en excelentes fuentes de compuestos de alto valor biológico [35]. Este interés surge del hecho que muchas microalgas y cianobacterias marinas han demostrado tener la capacidad de producir una gran variedad de compuestos bioactivos [7]. En los últimos años, dichos compuestos han surgido como tendencia para desarrollar nuevos alimentos funcionales que tienen como objetivo minimizar el riesgo de enfermedades crónicas en pacientes que tienen una predisposición genética.

Algunas especies, tanto de microalgas como de cianobacterias, pueden producir sustancias antioxidantes con el objetivo de proteger las células fotosintéticas del estrés oxidativo [7], así como una gran variedad de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados con beneficios para la salud humana. Además, existen ciertos productos que muestran, potencialmente, propiedades médicas interesantes, como los polisacáridos, las glicoproteínas, los lípidos, las vitaminas, las proteínas y los pigmentos.

De entre todos estos productos han adquirido un mayor protagonismo los pigmentos, ya que muchos de ellos tienen numerosas aplicaciones en medicina por tener propiedades anticancerígenas, antibacterianas, antiinflamatorias y antibióticas, entre otras. Con respecto a la aplicación como antibióticos, en los últimos años se ha observado un aumento en la resistencia bacteriana que, unido a la disminución de la eficiencia de los antibióticos, ha estimulado en gran medida la investigación sobre nuevas fuentes de antibióticos. Entre estas nuevas fuentes, las microalgas y las cianobacterias han demostrado tener un gran potencial escasamente explorado.

1.2.1. Situación actual

Tanto las microalgas como las cianobacterias son organismos fotosintéticos con numerosas ventajas ya que, aparte de ser utilizadas para la producción de biocombustibles, también son fuente de los denominados productos de alto valor añadido que tienen aplicaciones en diferentes sectores industriales (Figura 3). Cabe destacar algunos de los bioproductos como son: carotenoides (concretamente β -caroteno), astaxantina, ácido docosaheptaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), pigmentos naturales (clorofilas, ficobiliproteínas, y carotenoides), polisacáridos, lípidos, proteínas, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) [36].

INTRODUCCIÓN

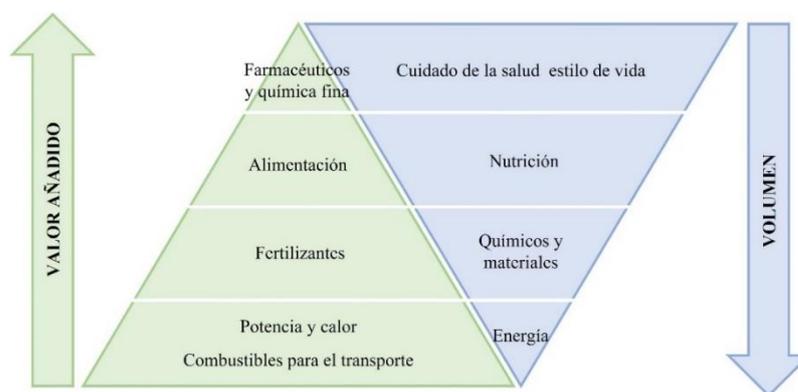


Figura 3. Pirámide de valores a nivel de mercado de los productos de valor añadido de las microalgas, modificado de [19].

En el pasado, la humanidad dependía de pigmentos naturales extraídos de plantas, animales y minerales como colorantes, hasta el descubrimiento del primer colorante sintético en 1856 por William Henry Perkin [37]. Debido a que los tintes sintéticos presentan mejores propiedades que los naturales, como puede ser la duración, el tono y la estabilidad, así como su alta disponibilidad y bajo coste, han sido utilizados mucho más que los extractos naturales en la coloración de productos.

Por ello, los agentes colorantes artificiales, usados como colorantes alimentarios han sustituido parcialmente durante muchos años a los colorantes naturales. Sin embargo, un gran número de investigadores señalan que tanto el uso de colorantes, como de otros aditivos alimentarios, deben reducirse ya que algunos de ellos han demostrado ser peligrosos para la salud. Su uso se ha asociado con enfermedades tales como el trastorno de déficit de atención e hiperactividad [38,39] y, más concretamente, algunos colorantes sintéticos del tipo azoico se han relacionado con el cáncer de vejiga en humanos, con el cáncer de bazo, hepatocarcinomas y anomalías nucleares en animales de experimentación y mutaciones cromosómicas en células de mamíferos [40–42]. Así mismo, se ha demostrado que algunos colorantes naturales, entre ellos los carotenoides y las ficobiliproteínas de las microalgas, presentan efectos preventivos para algunas enfermedades como la diabetes, la obesidad y enfermedades cardiovasculares [43]. Como consecuencia, en las últimas décadas han recibido especial atención tanto el escalado del cultivo de microalgas a nivel industrial para producir bioproductos y bioenergía, como sus aplicaciones.

Los pigmentos de microalgas y cianobacterias tienen un gran valor comercial como colorantes naturales, antioxidantes y vitaminas en la industria alimentaria y cosmética. Las cápsulas de β -caroteno de la microalga *Dunaliella salina* y la biomasa de la cianobacteria espirulina (*Arthrospira*) son ahora comúnmente comercializadas como suplementos alimenticios para mejorar la vitalidad y la longevidad de los seres humanos [44,45]. Esta reciente conciencia de los efectos nocivos de los tintes sintéticos unido a la inclinación de la sociedad hacia el uso de

productos naturales, como colorantes a base de plantas y microorganismos en alimentos y cosméticos, ha llevado al aprovechamiento de las microalgas como fuente de colorantes naturales [44,46]. A su vez, esta nueva percepción del consumidor representa un grave problema para las industrias de alimentación y cosmética, ya que para satisfacer la demanda de los consumidores y mantener la competitividad empresarial, necesitan reemplazar los colorantes sintéticos por colorantes naturales [43].

Las microalgas son una fuente muy interesante de colorantes naturales desde el punto de vista biotecnológico porque: (1) poseen una amplia gama de pigmentos, (2) crecen rápidamente en comparación con plantas superiores, (3) pueden contener pigmentos en concentraciones considerablemente mayores a las que se encuentran en las plantas superiores y (4) tienen facilidad en su cultivo ya que a menudo pueden crecer en ambientes marinos [47].

Por otro lado, las regulaciones sobre colorantes alimentarios varían en todo el mundo, lo que dificulta el debate sobre la legalidad a nivel universal de todos los pigmentos. Muchos países de América Latina y Europa han adoptado las especificaciones del *Codex Alimentarius* o del *Joint FAO* (Organización para la agricultura y la alimentación) junto con la *OMS* (Organización Mundial de la Salud). Otros, como Estados Unidos, Corea y Japón, regulan los colorantes alimenticios de forma independiente [48].

1.2.2. Compuestos de alto valor añadido en las microalgas

La mayor fuente de energía de nuestro planeta proviene del sol en forma de luz, de partículas indivisibles denominadas fotones. Por su parte, la luz visible se identifica con la región del espectro electromagnético que puede ser detectada por el ojo humano y corresponde al intervalo de 400 a 700 nm, aproximadamente. Este rango es el utilizado por la mayoría de los organismos para realizar la fotosíntesis [49]. La fotosíntesis es un proceso biológico de oxidación-reducción, en el que se obtiene energía química a partir de compuestos inorgánicos como sustratos y la energía electromagnética de la luz, captada mediante pigmentos especializados. La energía captada por estos pigmentos se transforma y almacena en forma de diferentes compuestos, principalmente carbohidratos.

Una de las características más destacadas de las microalgas y de las cianobacterias es su color, que está determinado por sus pigmentos. Estos pigmentos son sustancias químicas coloreadas que forman parte del sistema fotosintético de las microalgas. Como ya se ha mencionado, los principales pigmentos presentes en las microalgas y cianobacterias se pueden agrupar en: clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas (tabla 1). Las diferencias entre estos tres grupos de pigmentos están relacionadas por su estructura química [47]. La cantidad de cada pigmento en las microalgas puede variar enormemente según cada especie de microalga, constituyendo aproximadamente del 1 al 14% del peso seco, lo cual hace que su rentabilidad

INTRODUCCIÓN

económica sea más difícil de alcanzar en comparación con la de los colorantes sintéticos. Con respecto a las clorofilas, la mayoría de las especies de microalgas tienen un contenido de un 0,5-1% en peso seco, mientras que el contenido en carotenoides suele ser de un 0,1-0,2% en peso seco [21,35] y, por último, las ficobiliproteínas pueden llegar a constituir hasta un 8% en peso seco de la célula [50].

Para que tanto las microalgas como las cianobacterias puedan ser consideradas adecuadas para la producción de pigmentos comerciales deben cumplir varios criterios como: facilidad de cultivo, ausencia de toxicidad, alto valor nutricional, presencia de paredes celulares que sean digeribles fácilmente para que los nutrientes estén disponibles, etc. [35].

Tabla 1. Principales pigmentos de microalgas y su color característico. Modificada de [35,38].

Pigmento	Compuesto	Absorción (λ max)	Color	Microalga/cianobacteria	
Ficobiliproteínas	Aloficocianina B	671 nm		<i>Arthrospira</i> sp.	
	Aloficocianina A	650 nm		<i>Arthrospira</i> sp.	
	Ficocianina	615-620 nm		<i>Arthrospira</i> sp.	
	Ficoeritrina	500-580 nm		<i>Porphyridium</i> sp.	
Clorofila	Clorofila a	663 nm		<i>Dunaliella salina</i> .	
	Clorofila b	652 nm		<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella</i> sp.	
Carotenoides	β caroteno	455 nm		<i>Dunaliella salina</i> , <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Arthrospira</i> sp.	
	Fucoxantina	490 nm		<i>Phaeodactylum tricorutum</i> .	
	Luteína	445 nm		<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Muriellopsis</i> sp.	
	Astaxantina		482 nm		<i>Haematococcus pluvialis</i> .
					<i>Chlorella</i> sp.

La principal función de los pigmentos en estos microorganismos es la absorción de energía a diferentes longitudes de onda presentes en el espectro de luz visible (figura 4).

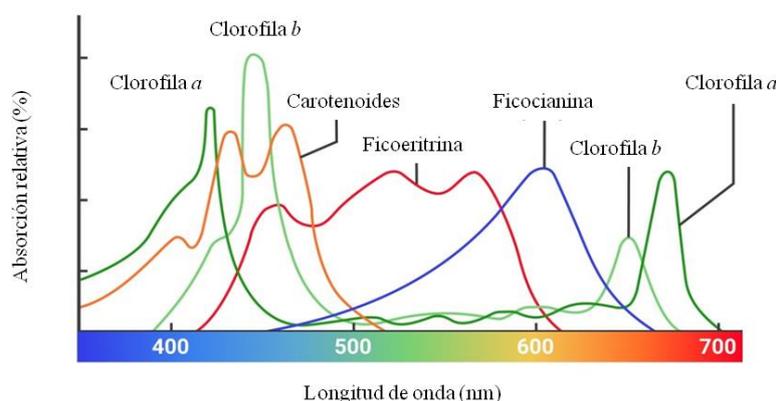


Figura 4. Espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos. Modificada de <https://www.circuitbread.com/ee-faq/how-are-leds-used-for-growing-plants> (2022).

La mayoría de los pigmentos se distribuyen generalmente como complejos de proteínas y se encuentran dentro de las membranas de los tilacoides de los cloroplastos [19]. La

INTRODUCCIÓN

composición de los pigmentos es uno de los criterios más importantes para diferenciar las diversas clases de microalgas. Es importante destacar que las clorofilas y los carotenoides, de forma general, son moléculas liposolubles, mientras que las ficobilinas, que son compuestos cromóforos tetrapirrólicos que se encuentran como grupos prostéticos en las ficobiliproteínas; son solubles en agua.

❖ Clorofilas

Las clorofilas son el pigmento natural verde más abundante que sustenta la fotosíntesis oxigénica en microalgas y cianobacterias, de donde deriva la energía para el metabolismo y la reproducción. En las microalgas (eucariotas) se localizan en los cloroplastos, asociadas con proteínas de membrana en la membrana tilacoidea; pero en las cianobacterias (procariontes) se encuentran en las laminillas fotosintéticas [50]. Dentro de las propiedades bioactivas que presenta la clorofila, se encuentran su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antitumoral [51].

Estructura de las clorofilas

La clorofila está conformada por dos tipos de estructuras químicas: un anillo de tetrapirrol y una cadena fitol (alcohol diterpénico) hidrófoba (figura 5). El anillo de tetrapirrol consta de cuatro anillos de pirrol, denominados porfirina, con magnesio como ion metálico central que une a las moléculas de nitrógeno del anillo de tetrapirrol a través de enlaces coordinados [52].

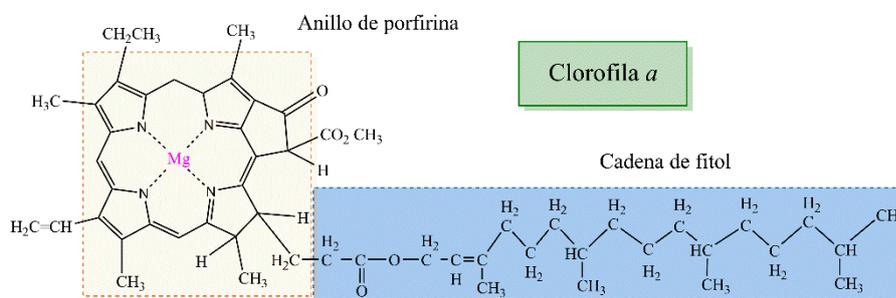


Figura 5. Estructura molecular de la clorofila *a*. Elaboración propia.

Tipos de clorofilas

Existen dos tipos principales de clorofila, la *a* y la *b*, siendo la clorofila *b* la más estable. La clorofila *a* es el pigmento principal que se encuentra en todas las microalgas y es vital para la fotosíntesis. La mayoría de las algas verdes contienen clorofila *a* y *b*, mientras que las algas de color parduzco generalmente contienen clorofila *a* y *c* [19]. La principal diferencia entre las clorofilas *a* y *b* y la clorofila *c* es que la mayoría de las clorofilas *c* no presentan la cadena de fitol característica [53].

Los enlaces simples y dobles presentes en la clorofila permiten la localización y deslocalización de los electrones, lo que la convierte en un poderoso fotorreceptor. La diferencia

INTRODUCCIÓN

entre los sustituyentes, tanto del anillo porfirínico como de la cadena de fitol, son las que dan lugar a los diferentes tipos de clorofila. Para el caso de las dos clorofilas principales, la clorofila *b* se diferencia de la clorofila *a* en la sustitución de un grupo metilo, por un grupo aldehído (figura 6).

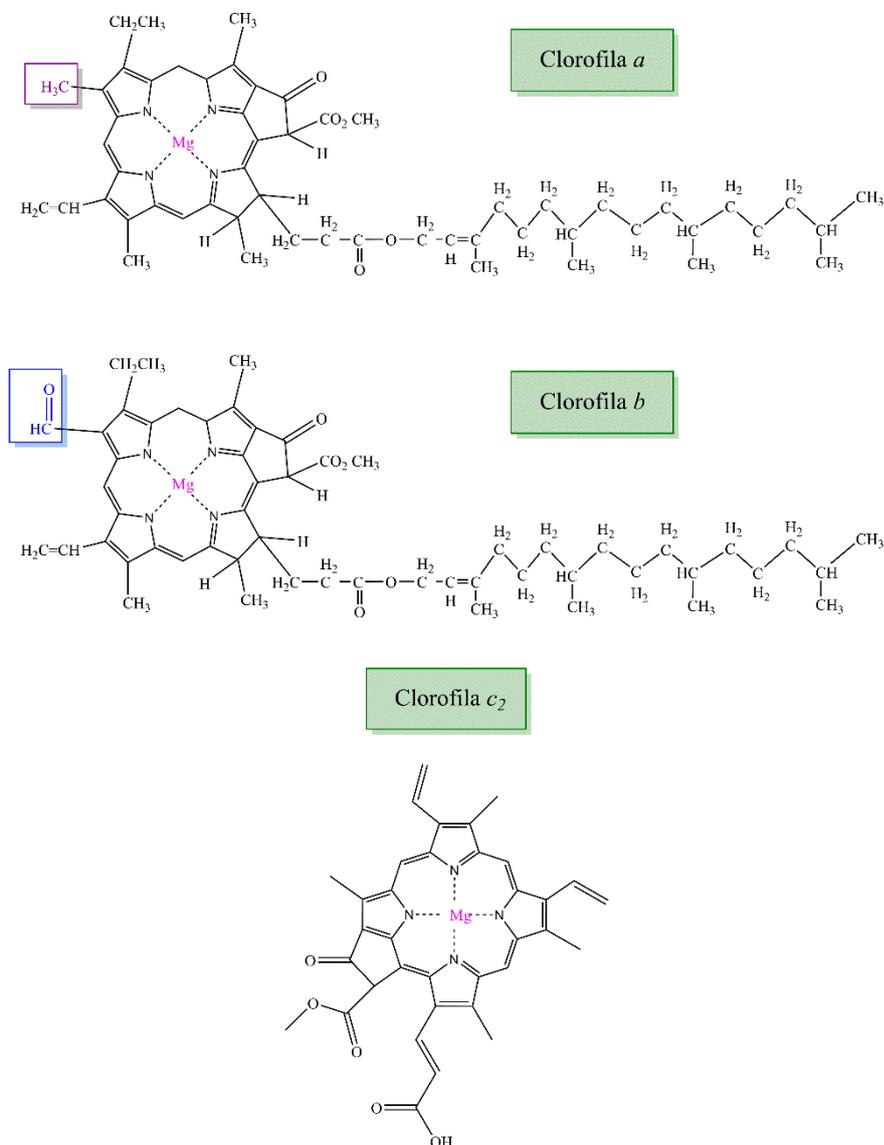


Figura 6. Estructura molecular de la clorofila *a*, *b* y *c* (*c*₂). Elaboración propia.

Funciones, aplicaciones y propiedades de las clorofilas

Observando la estructura de la clorofila cabe destacar que la función principal del anillo de porfirina es absorber la luz mientras que la cadena de fitol se ocupa de mantener la clorofila integrada en la membrana fotosintética. La principal diferencia entre la clorofila *a* y *b* es su papel en la fotosíntesis. La clorofila *a* es el principal pigmento involucrado en la fotosíntesis y tiene un doble papel: es la encargada de absorber energía luminosa y participa en la conversión de la energía de los fotones absorbidos en energía química [54]. Esta energía produce la excitación de

INTRODUCCIÓN

los electrones y provoca la ruptura de las moléculas de agua, de tal forma que el oxígeno se libera y el resto de energía se transmite, generando moléculas de ATP (adenosina trifosfato) y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Gracias a la etapa oscura, la energía en forma de ATP y NADPH se utiliza para fijar el dióxido de carbono como carbono orgánico y da como resultado glucosa. Por su parte, la clorofila *b* es el pigmento complementario o secundario, que recoge la energía para transferirla a la clorofila *a* [55].

Tanto el efecto antimicrobiano y antiinflamatorio de las clorofilas, como su capacidad para estimular la cicatrización de heridas y úlceras, han sido estudiados en numerosas ocasiones. La clorofila también es popular como aditivo antiséptico y, en el ámbito cosmético, se ha utilizado para pieles grasas, pieles con acné y productos para el cuidado del cuero cabelludo [20,56].

❖ Carotenoides

Los organismos fototróficos sintetizan, no solo clorofilas para la fotosíntesis, sino también carotenoides. Este grupo de pigmentos liposolubles comprende más de 700 pigmentos responsables de la tonalidad rojiza, naranja o amarillenta. En las microalgas los carotenoides pueden encontrarse en las membranas tilacoidales de los cloroplastos o en el interior de cuerpos lipídicos [57].

La mayoría de los carotenoides son hidrocarburos que contienen 40 átomos de carbono y dos anillos terminales [58], son tetraterpenoides (C₄₀) que constan de 8 unidades de isopreno enlazadas de forma que la molécula sea lineal y simétrica, con el orden invertido en el centro.

Tipos de carotenoides

Según su estructura química, los carotenoides pueden clasificarse en carotenos, que son hidrocarburos lineales que pueden ciclarse en uno o ambos extremos de la molécula y en xantofilas, las cuales son derivados oxigenados de carotenos [47]. El principal representante de los carotenos es el β -caroteno mientras que para las xantofilas es la luteína.

De los más de 600 carotenoides conocidos, sólo un número reducido se utiliza comercialmente. Entre estos se encuentran β -caroteno, licopeno, astaxantina, criptoxantina, zeaxantina y luteína, en la figura 7 se muestran algunas estructuras de los carotenoides más importantes presentes en las microalgas. Entre ellos, aproximadamente una treintena exhiben posibles funciones fotosintéticas.

INTRODUCCIÓN

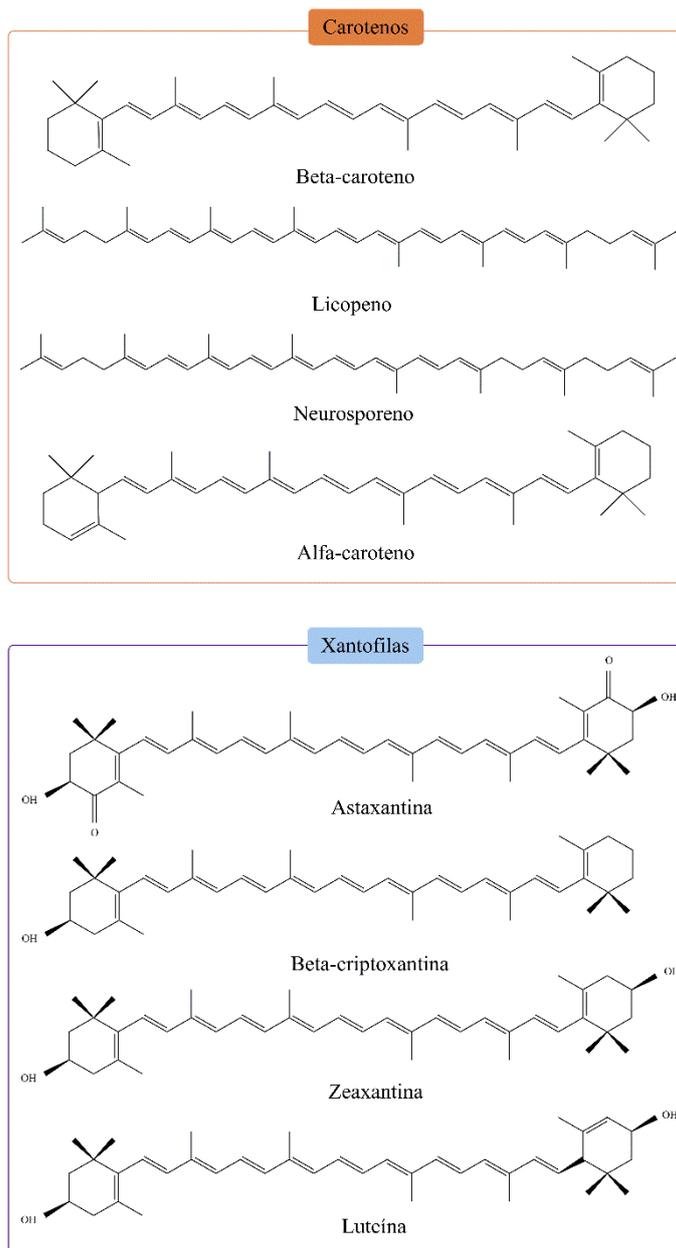


Figura 7. Estructuras de algunos carotenoides. Modificado de [50,58].

El β -caroteno es el carotenoide más utilizado en alimentación y en aditivos, encontrándose comúnmente en las cianobacterias y en las microalgas. Por el contrario, la luteína se encuentra exclusivamente en las algas verdes del filo Chlorophyta y en algunos protistas flagelados verdes del grupo Dinophyta [47].

Funciones, aplicaciones y propiedades de los principales carotenoides

Su función dentro de la célula depende de su localización. De esta forma, si se encuentran cerca del centro de reacción, absorben la energía que no ha sido absorbida por la clorofila y la canalizan hasta ella, mientras que, si se encuentran concentrados en las membranas, debido a que son compuestos anfipáticos, su función en este caso será la de proteger a la célula de la oxidación.

Dentro de ésta última, el β -caroteno participa activamente en la fotoprotección de la clorofila, debido a su capacidad antioxidante [47]. Los pigmentos que actúan como fotoprotectores son los que intentan evitar el daño a la autooxidación, causada por una alta sobreexposición a la intensidad lumínica o durante largos tiempos de exposición. Para poder comprender cómo sucede el proceso de autooxidación que sufre la célula, proceso que es consecuencia de la fotosíntesis, es necesario conocer que existe una velocidad de transferencia de energía entre el centro de reacción (clorofila *a*) y la cadena que transporta los electrones. De igual forma, existe una velocidad de recolocación de los fotones, desde los pigmentos hasta el centro de reacción. Cuando esta velocidad es inferior que la velocidad a la cual la clorofila *a* recibe fotones, la clorofila *a* entra en un estado de oxidación. De esta forma, se convierte en un compuesto inestable que, aunque no es dañino por sí mismo, transloca esta energía a una molécula de oxígeno, que genera especies reactivas que pueden atacar al ADN y que podrían causar daño a las células.

Por otro lado, se han descrito diversas propiedades terapéuticas para los carotenoides. Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que un alto consumo de carotenoides en la dieta disminuye el riesgo de contraer enfermedades asociadas con la formación de radicales libres. Entre estas enfermedades se encuentran diversos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, etc. [57].

Con respecto a la luteína, se almacena en nuestro cuerpo en la retina y el cristalino de los ojos [58]. Algunos estudios han demostrado que altos niveles de ingestión de luteína, particularmente en alimentos ricos en xantofilas como puede ser las espinacas, el brócoli y los huevos, tienen relación con una importante reducción de cataratas (más del 20%) y degeneración macular debido a la edad (más del 40%) [59,60].

❖ **Ficobiliproteínas**

La energía solar en longitudes de onda de 400 a 700 nm (radiación fotosintéticamente activa) es capturada por los organismos fotosintéticos y convertida en energía química que puede ser utilizada directamente por los seres vivos. A diferencia de las plantas superiores y las algas verdes, las principales antenas recolectoras de luz en las cianobacterias y algas rojas son un gran complejo proteico de múltiples subunidades llamado ficobilisoma que se descubrió en 1960 [61] y que se encarga de captar la luz solar y migrarla hacia los centros de reacción del fotosistema II [62]. Cuando la energía absorbida alcanza los centros de reacción del fotosistema II, se produce una transducción de la energía de excitación a energía química.

Los ficobilisomas, que parecen estar restringidos a las cianobacterias, las glaucofitas, las algas rojas y las criptomonas [63], se encuentran en la superficie de la membrana tilacoidal de estos microorganismos dispuestos a menudo en filas paralelas entre sí. Se componen en gran parte de ficobiliproteínas, incluida la ficobiliproteína azul (ficocianina), que es considerada producto

INTRODUCCIÓN

de alto valor con aplicaciones industriales. Varias especies de cianobacterias y algas rojas, sorprendentemente, conservan la capacidad de recolectar la luz solar y realizar la fotosíntesis en entornos altamente selectivos, como aguas termales, en condiciones extremas de pH y a temperaturas elevadas. Estos organismos termófilos producen ficobiliproteínas termoestables [64], que tienen cualidades más que suficientes para incorporar estas proteínas como pigmentos naturales en las industrias alimentaria y textil, entre otras.

Las ficobiliproteínas son una familia de proteínas de colores brillantes (fucsia, púrpura-azul y cian), autofluorescentes, solubles en agua y pueden llegar a constituir el 60% de la proteína soluble en estas células [65].

Estructura y tipos de ficobiliproteínas

Estas proteínas se encuentran formadas por una parte proteica y un cromóforo denominado ficobilina. Ésta se encuentra unida mediante un enlace covalente (tioéter) a un aminoácido de cisteína de la cadena polipeptídica. Las ficobilinas están formadas por grupos prostéticos tetrapirrólicos similares a las clorofilas y éstos, al presentar enlaces dobles y sencillos alternados, pueden deslocalizar electrones como consecuencia de una excitación luminosa a una determinada longitud de onda.

Cada una de las diferentes ficobiliproteínas está formada por dos subunidades polipeptídicas no idénticas (α y β), que contienen una o más ficobilinas unidas covalentemente [35]. Hay varios tipos de ficobilinas, estructuralmente distintos, con diferentes propiedades espectroscópicas [65], lo que conlleva que cada tipo de ficobiliproteína absorba luz a distintas longitudes de onda (figura 8). Las ficobiliproteínas se pueden dividir en tres grupos principales basándose en sus propiedades espectrales: ficoeritrina (PE) (pigmento fucsia, $A_{\max}=560$ nm), ficocianina (PC) (pigmento azul, $A_{\max}=615-620$ nm), y aloficocianina (APC) (pigmento cian, $A_{\max}=650$ nm). (cromóforos de las ficobiliproteínas). En la ficoeritrina se pueden encontrar dos tipos de cromóforos, la ficoeritrobilina (PEB) y la ficourobilina (PUB). Mientras que la ficocianina y aloficocianina poseen únicamente un tipo de cromóforo que es la ficocianobilina (PCB) [65].

INTRODUCCIÓN

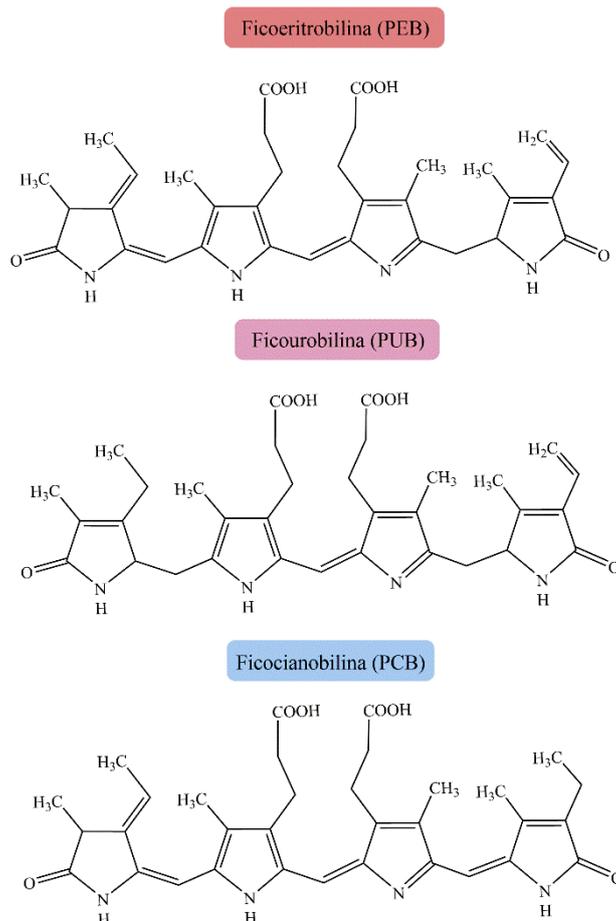


Figura 8. Estructura química de las principales ficobilinas.

Hasta la fecha, hay sesenta y una estructuras de ficobiliproteínas depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (*Protein Data Bank*, <https://www.rcsb.org/>). De éstas, doce estructuras corresponden a ficoeritrina; treinta y seis son ficocianina y diez aloficocianina. Todas estas estructuras se han obtenido mediante la técnica de difracción de rayos X [49].

La estructura de la PCB, similar a la de la bilirrubina y biliverdina, está formada por un tetrapirrol de cadena abierta y es responsable del color azul intenso de la PC. Por su parte, el componente proteico de la PC consta de dos subunidades de proteínas homólogas, denominadas cadenas α y β , unidas covalentemente a la PCB por un enlace tioéter (figura 9) [66]. Una molécula de PCB está unida a la subunidad α y dos a la β . Según Vucinic y colaboradores [67], la cadena α está unida al cromóforo (PCB) a través de la cisteína 84 y la cadena β se une a dos PCB a través de las cisteínas 82 y 153, respectivamente. Sin embargo, Padyana y colaboradores [68] afirmaron que en su secuencia las PCB se encuentran en las posiciones α 84, β 84 y β 155.

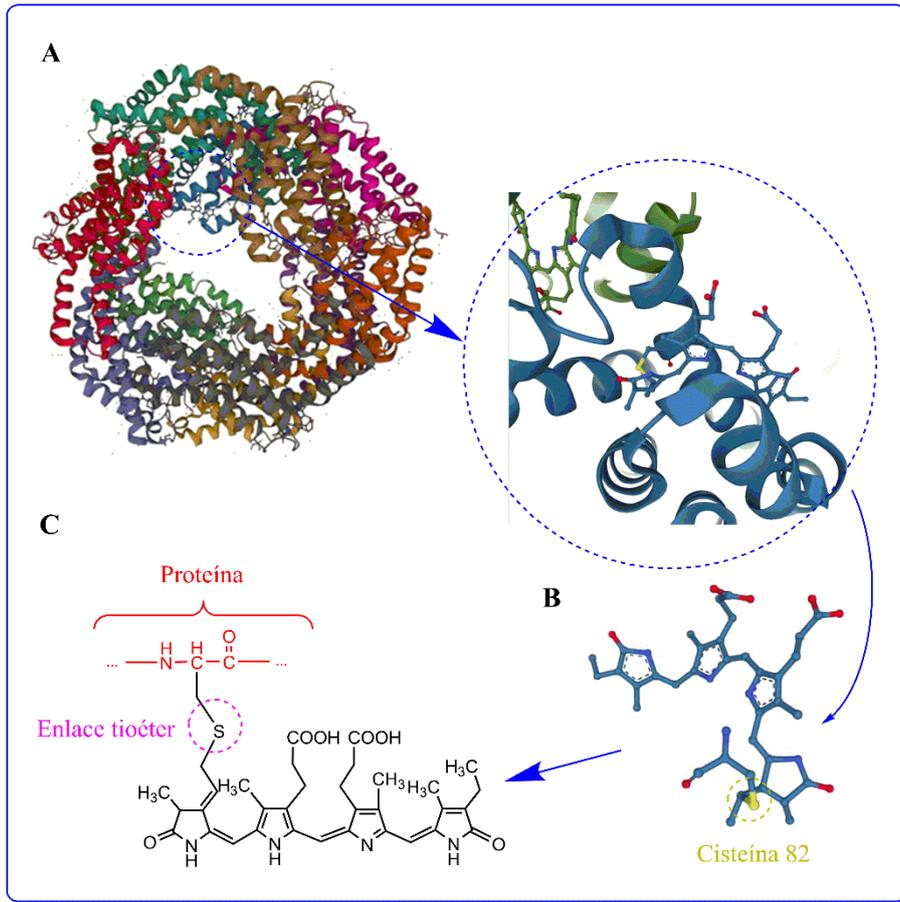


Figura 9. A) Estructura de la PC en forma de hexámero (Fuente: <https://www.rcsb.org>), B) Cromóforo de la PC (PCB) y la unión a través de la cisteína 82, C) Estructura química de la PCB, el cromóforo responsable del color azul de la PC, modificado de [66].

Como se ha mencionado, la estructura de la PC procedente de *Arthrospira platensis* está formada por dos tipos de cadenas polipeptídicas (cadenas α y cadenas β) con gran afinidad entre ellas, asociándose y formando monómeros (α/β). Estos monómeros, a su vez, se asocian formando trímeros (α/β)₃ y hexámeros (α/β)₆ (figura 10-11) [68].

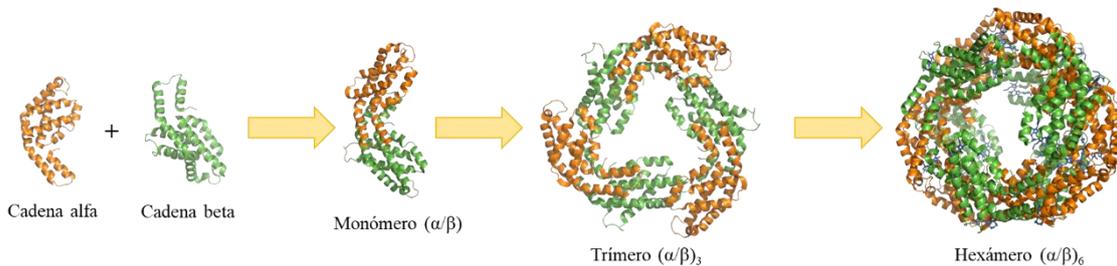


Figura 10. Distintos niveles de estructura de la ficocianina (cadena alfa, cadena beta, monómero, trímero y hexámero).

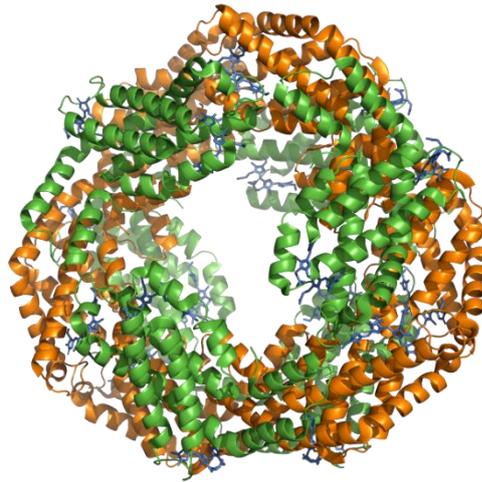


Figura 11. Estructura de la ficocianina en forma de hexámero (α/β)₆ (en color azul se muestran las PCB).
Representación a partir de la secuencia 1HA7 (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>).

Distribución de las ficobiliproteínas

A diferencia de los carotenoides y clorofilas y, debido a su carácter hidrosoluble, las ficobiliproteínas forman una estructura denominada ficobilisoma, adherida a la superficie citoplasmática de las membranas de los tilacoides [69] y asociada preferentemente al fotosistema II de las microalgas. En dicho sistema, las ficobiliproteínas se encuentran organizadas en tres capas dispuestas de tal forma que se facilita la transferencia de energía lumínica captada hacia el centro de reacción, localizado en la membrana del tilacoide.

Los ficobilisomas tienen dos regiones diferentes, un núcleo compuesto principalmente de aloficocianina y alrededor de él se encuentran una serie de extensiones denominadas ROD, compuestas por ficocianinas y/o ficoeritrinas. Se caracteriza porque su parte interna está compuesta por hexámeros de ficocianina mientras que la parte externa por hexámeros de ficoeritrina (figura 12).

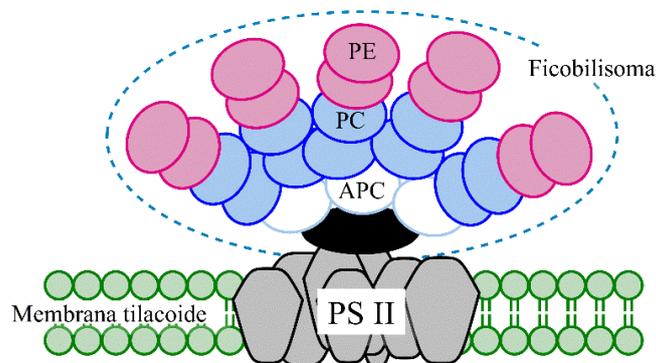


Figura 12. Modelo simplificado del ficobilisoma (junto con las ficobiliproteínas que lo forman) unido al fotosistema II (PS II) a través de una cadena peptídica (negro), modificado de [70].

INTRODUCCIÓN

Tal y como se aprecia en la figura 12 las ficoeritrinas tienen un color fucsia intenso y, por ende, contienen la mayor diversidad de cromóforos entre las ficobiliproteínas. Se encuentran localizadas en la parte más alejada de las varillas del ficobilisoma. La ficocianina es una proteína de color azul intenso que se encuentra en la parte próxima a los bastones de los ficobilisomas. A diferencia de la ficoeritrina, la ficocianina siempre está presente en cianobacterias y algas rojas. La aloficocianina tiene un color cian brillante y se encuentra exclusivamente como parte del núcleo del ficobilisoma.

Funciones, aplicaciones y propiedades de las principales ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas juegan un papel muy importante en la fotosíntesis ya que permiten capturar la energía luminosa en el rango de 450 a 650 nm y enviarla a los fotosistemas. Éstos, a su vez, transfieren la energía a las clorofilas permitiendo que se lleve a cabo la fotosíntesis en cianobacterias, algas rojas, glaucofitas y criptomonas [49,71] y pueden representar el principal absorbente de luz en estos microorganismos [72] ya que absorben la radiación en regiones del espectro visible donde la clorofila *a* tiene bajas absorptividades [62].

Una de las aplicaciones más importantes de las ficobiliproteínas es su amplio uso en ensayos inmunológicos debido a su alta fluorescencia, su buena estabilidad al almacenamiento a temperaturas entre 4 y 10°C, su alto coeficiente de absorción molar y su alta fotoestabilidad [73]. Esto las convierte en reactivos muy potentes y altamente sensibles que se pueden enlazar fácilmente a los anticuerpos sin cambiar sus propiedades espectrales [74]. Por otro lado, las ficobiliproteínas tienen importantes propiedades biológicas para los humanos y para los animales, lo cual incentiva el desarrollo de una nueva biotecnología de productos y procesos [56,75]. Recientemente, en varios estudios se han descrito diversas bioactividades de las ficobiliproteínas, tales como antioxidantes, antiinflamatorias, antimetabólicas, anticancerígenas, antineurogenerativas y antipatógenas [49].

Una de las aplicaciones para el caso concreto de la ficocianina, ficobiliproteína de estudio en la presente tesis, es su uso como pigmento o colorante alimentario, reemplazando a los pigmentos sintéticos actuales. Se ha desarrollado un producto llamado Lina Blue que se usa en los chicles, sorbetes, helados, dulces y refrescos. Otra forma de comercializar este pigmento es en el ámbito de la cosmética natural, como pintalabios y delineador de ojos [21]. Para poder producir ficobiliproteínas a partir de cianobacterias para una aplicación industrial es necesario optimizar el conjunto del bioproceso. Dentro de estos parámetros se incluyen la luz, la fuente de nitrógeno y carbono, el pH, y la temperatura, que afectan al crecimiento de la cianobacteria y a la acumulación de ficobiliproteínas [76].

Las cianobacterias evolucionaron como organismos capaces de adaptarse a condiciones muy extremas. Estas evoluciones o adaptaciones suelen estar relacionadas con la producción de

ciertos compuestos de defensa, produciendo muchos productos naturales y compuestos de alto valor. Estos metabolitos se generan debido al estrés al que está expuesto el microorganismo, y, por ello, para la optimización de las condiciones implicadas en la producción de un compuesto de alto valor añadido se deben tener en cuenta numerosos factores.

1.2.3. Factores que afectan a la producción de pigmentos en las microalgas

Al igual que los factores ambientales afectan al crecimiento de las microalgas y cianobacterias (ver *apartado 1.1.2*) e influyen en la composición celular de las mismas, al generarse una situación de estrés en las microalgas es posible alterar ese crecimiento celular y aumentar la producción de los pigmentos. Algunos factores que pueden ser los causantes del mencionado estrés son: la luz, la temperatura, la disponibilidad o no de nutrientes, la salinidad y el pH [34,77].

❖ La luz

La luz es uno de los factores más importantes en la producción de pigmentos [77] puesto que éstos son los principales captadores de energía lumínica para poder llevar a cabo la fotosíntesis. Así, cambios en la intensidad de luz, longitud de onda y tiempos de exposición generan cambios en la acumulación de pigmentos. Tiempos cortos de exposición de luz o baja intensidad de luz, repercuten en una baja captación de energía, por lo que las células se ven obligadas a aumentar el número de pigmentos antena para poder captar así mejor la energía que llega a los fotosistemas. Es por esto por lo que la clorofila y las ficobiliproteínas son los pigmentos que se ven influenciados en mayor medida por una baja exposición a la luz [38].

Por otro lado, como ya se ha mencionado, los carotenoides son sintetizados en respuesta a una situación de estrés, como puede ser una sobreexposición a la luz solar. Su función es evitar el daño celular causado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que los parámetros de exposición a la luz solar también tienen efecto sobre la producción de carotenoides. Comúnmente, en la etapa de cultivo de microalgas se emplea luz artificial como herramienta que hace posible controlar la longitud de onda, intensidad, y tiempo de exposición de ésta. Dentro de las técnicas utilizadas, se encuentra la de la variación de la longitud de onda, la cual se basa en que los pigmentos absorben en un determinado rango de longitud de onda en la cual la absorción de energía es mayor, siendo la longitud de onda diferente para cada pigmento (figura 3). Por lo que, si se somete a la microalga a iluminación con una longitud de onda determinada, se va a reducir el intervalo en el cual puede captar energía y, en consecuencia, esta microalga tenderá a incrementar la concentración de los pigmentos correspondientes.

Otro factor limitante a tener en cuenta, tanto en el crecimiento como en la producción de pigmentos, es el efecto de autosombreado. Este fenómeno se genera cuando existe una gran concentración de células que impiden el paso de la luz en el cultivo y, por ello, la cantidad de luz

que reciben las células disminuye. Debido a esta disminución, el crecimiento de la microalga y la producción de pigmentos se ve negativamente afectada. Existen dos técnicas para subsanar este inconveniente: 1) intervalos de luz/oscuridad controlados (fotoperiodos) o 2) incremento gradual de la intensidad de luz. Lo que se pretende asegurar es que, aunque exista un incremento de células, éstas siempre se encuentren sometidas a un exceso de luz, por lo que, con esta condición de estrés, no dejarán de generar pigmentos, en este caso carotenoides [50,78,79].

Con respecto a las ficobiliproteínas, se ha observado que se produce una mayor cantidad de ficocianina bajo una luz roja y mayor cantidad de ficoeritrina bajo luz verde en la cianobacteria *Nostoc muscorum* [80]. De igual forma, en *Arthrospira platensis* se observó que la producción tanto de biomasa como de ficocianina aumentó en un 26% y 44%, respectivamente, utilizando concentradores solares luminiscentes bajo una longitud de onda correspondiente a la luz roja [81]. Esto es debido a la necesidad de la cianobacteria de absorber un intervalo específico de longitudes de onda para garantizar la eficiencia fotosintética; la ficocianina absorbe luz en el rango amarillo-rojo, mientras que la ficoeritrina en el rango verde. Sin embargo, la aclimatación a las diferentes calidades de luz depende de las distintas especies de microalgas como sucede, por ejemplo, para el caso del género *Anabaena* que aumenta la productividad de ficobiliproteínas bajo luz azul [82].

Aun así, cabe destacar que no se pueden fijar unas condiciones estándar para aumentar la producción de los pigmentos, ya que cada especie de microalga o cianobacteria responde de una manera diferente a las condiciones de estrés lumínico.

❖ La temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes en la producción de cianobacterias y microalgas. La diversidad y los productos metabólicos están estrictamente relacionados con la variación de temperatura, por lo tanto, la condición óptima para el crecimiento o la producción de compuesto depende de la adaptación y tolerancia de cada cepa [34].

Con respecto a los carotenoides, Campo y colaboradores [50,83] estudiaron el rango de temperatura de 20 a 28°C para la producción de luteína en la cepa *Chromochloris zofingiensis* y pudieron concluir que una mayor temperatura inducía un mayor contenido en luteína. En *D. salina* se observó que el contenido de β -caroteno fue óptimo en el intervalo 25-30°C [84]. Con lo que, de forma general, se puede concluir que un aumento de la temperatura favorece una mayor producción de carotenoides. En relación con el efecto de la temperatura sobre *A. platensis*, la producción de ficobiliproteínas es potenciada a valores iguales o superiores a 30°C [77,85].

❖ Disponibilidad de nutrientes

El uso de fuentes de carbono, tales como glucosa, sacarosa y fructosa, entre otras, para la producción a escala industrial de cianobacterias, puede resultar económicamente viable para la producción de compuestos bioactivos, productos químicos y farmacéuticos. Zhang y colaboradores [86] concluyeron que cierta adición de glucosa en la etapa de cultivo producía un aumento en la concentración de ficocianina, pero la cantidad de glucosa óptima necesaria depende estrechamente de la intensidad de la luz utilizada. Por otro lado, el suministro de carbono puede provenir también del CO₂ y se pudo observar que la inyección intermitente de CO₂ en un flujo continuo de aire comprimido mejoró tanto el crecimiento como la producción de ficobiliproteínas para *A. platensis* [87]. Probablemente, esto es debido a un mejor equilibrio entre el metabolismo y la nutrición del microorganismo. También existe la posibilidad de no tener una fuente de carbono, esto puede ser positivo para la producción de ficobiliproteínas. Sharma y colaboradores [74] observaron que la deficiencia de carbono condujo a una mayor producción de ficobiliproteínas, ya que estos pigmentos colaboran en la estrategia de defensa del organismo y, en una situación de estrés, actuarán de forma que protegerán la membrana del fotosistema del daño que pueda ocasionar la luz.

El nitrógeno es el segundo nutriente más requerido para el crecimiento y para la producción de metabolitos, después del carbono. En el caso de las cianobacterias, la fuente y las cantidades pueden variar entre especies. Tienden a preferir el uso de nitratos, pero algunas especies pueden usar urea y amoníaco. Cabe destacar que el nitrógeno es fundamental para la producción de ficobiliproteínas ya que estos pigmentos son el principal almacén de nitrógeno para las cianobacterias, lo que significa que, en condiciones de estrés, los niveles de nitrógeno cambian. En relación a la fuente de nitrógeno, Hemlata y Fatma [34] observaron que *Anabaena* sp. producía más ficocianina cuando no se añadía ninguna fuente de nitrógeno al medio, pero esto puede variar según la especie.

Con respecto a los carotenoides, para algunas microalgas, la disponibilidad de nitrógeno también afecta a su acumulación. De esta forma, una limitación en este nutriente incrementa el nivel de β -caroteno en *Dunaliella* sp. Para el caso de *Haematococcus* sp. algunos estudios han afirmado que la acumulación de astaxantina se estimula igualmente por una limitación en el nitrógeno [88].

❖ pH

De forma general el pH afecta mucho más a las ficobiliproteínas que a los carotenoides [89]. En el caso de las cianobacterias, suelen preferir un entorno alcalino, tanto para el crecimiento como para la producción de ficobiliproteínas [87]. Por ejemplo, para especies como *Nostoc muscorum*, *Nodularia sphaerocarpa*, *Anabaena* sp., y *Gloeocapsa* sp., el pH óptimo es 8, para

INTRODUCCIÓN

Arthrospira platensis el pH óptimo es 9, mientras que para cianobacterias como *Anabaena fertilissima* y *Synechocystis* sp. el pH óptimo está por encima de 9.

Para el caso de los carotenoides y, concretamente el β -caroteno, se ha estudiado el efecto del pH sobre la acumulación de este pigmento. Con respecto a *Dunaliella* sp., Celeki y colaboradores [90] demostraron el efecto que tiene el pH, en el intervalo 6-9, en la acumulación de este pigmento, obteniéndose una mayor producción de β -caroteno para el pH mayor.

❖ La salinidad

La salinidad es un factor fundamental para el crecimiento y también para la producción de metabolitos de las cianobacterias marinas, pudiendo cambiar su efecto para cada especie ya que cada una de ellas tiene su propia adaptación. Sin embargo, el estrés salino puede inhibir el crecimiento y la actividad fotosintética de las cianobacterias.

Con respecto a las ficobiliproteínas, en el caso concreto de *Arthrospira platensis*, los altos niveles de salinidad pueden tener efectos positivos hasta cierta concentración, a partir de la cual, se comienza a inhibir el proceso de crecimiento y la producción de ficobiliproteínas [74]. En el caso de los carotenoides, para favorecer la acumulación de β -caroteno en la microalga *Dunaliella* sp., Celeki y colaboradores [90] informaron que a pH 9, la acumulación de β -caroteno aumentó según se incrementaba la concentración de NaCl, obteniendo el máximo para una concentración de 20% de NaCl. A modo de resumen, en la tabla 2 se muestran alguna de las estrategias para incrementar la acumulación de los principales pigmentos.

Tabla 2. Estrategias utilizadas para incrementar la acumulación de los principales pigmentos en microalgas y cianobacterias modificado de [38].

Pigmento	Propiedades/Aplicaciones	Microalga	Estrategias de producción
β -caroteno	Precursor vitamina A, antioxidante	<i>Dunaliella</i> sp.	Alta intensidad luminosa Limitación de nitrógeno Temperaturas superiores a 15°C
		<i>Scenedesmus</i> sp.	Alta intensidad luminosa
Astaxantina	Antioxidante, colorante alimentario, mejora las funciones del sistema inmune	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Exposición a longitudes de onda de 470nm (luz LED azul) Aumento de la temperatura del cultivo
Luteína	Aditivo de alimentos, disminuye el riesgo de cataratas y enfermedades cardiovasculares	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Exposición a diferentes longitudes de onda
Clorofila	Antioxidante, colorante alimentario	<i>Chlorella vulgaris</i>	Utilización de luz roja
Ficocianina	Marcador fluorescente, antioxidante, antiinflamatorio y neuroprotector	<i>Arthrospira platensis</i>	Utilización de luz verde
			Utilización de luz roja Exceso de nitrógeno en la etapa de cultivo
Ficoeritrina	Marcador fluorescente, colorante utilizado en la industria alimentaria y cosmética	<i>Porphyridium marinum</i>	Estudio y modificación del medio de cultivo

Tal y como se muestra en la tabla 2, en muchos casos un solo factor de estrés no puede únicamente por sí mismo promover la acumulación de pigmentos [89]. Este es el caso de los carotenoides y de las ficobiliproteínas, que necesitan de la combinación de varios factores.

En los últimos años, se han desarrollado una gran variedad de métodos de estrés combinados para aumentar la síntesis de carotenoides en los microorganismos. En uno de estos estudios, Christian y colaboradores [91] utilizaron un modelo que combinaba la alta luminiscencia durante la fase de crecimiento de *H. pluvialis* con altos niveles de CO₂ y baja intensidad de luz en la optimización de la producción del pigmento, que dio como resultado una mejora significativa en la producción de astaxantina.

Paralelamente, también se han desarrollado otros métodos de estrés combinados para aumentar la acumulación de las ficobiliproteínas, concretamente de ficocianina. Se estudiaron tanto el efecto del nitrógeno, como del NaCl para *A. maxima* y *A. platensis* [92]. El contenido de ficocianina dependía de la variación en la concentración de nitrógeno durante la etapa de cultivo, de forma que, para las especies mencionadas, la disminución de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo conllevaba una disminución en el contenido de ficocianina. Por el contrario, si se incrementaba la concentración de nitrógeno la cantidad de ficocianina aumentaba progresivamente hasta valores altos de 12,08 y 9,94% (en peso seco) para *A. platensis* y *A. maxima*, respectivamente. Hanaa y colaboradores [92] también evaluaron el efecto de incrementar el contenido en NaCl en el medio y observaron que se producía un incremento muy significativo en la cantidad de ficocianina acumulada. Como conclusión cabe destacar que tanto *A. platensis* como *A. maxima* cultivadas bajo estrés combinado de deficiencia de nitrógeno y una baja concentración de NaCl, acumulan menos ficocianina que si crecen en un medio con suficiente nitrógeno y con una elevada concentración de NaCl.

1.2.4. Importancia del color azul: Ficocianina

Los colorantes alimentarios se han convertido en un ingrediente indispensable hoy en día en las preparaciones de alimentos para generar una mayor atracción al consumidor, puesto que juegan un papel muy importante en la mejora del atractivo estético de los productos.

Por ello, la industria alimentaria busca ampliar tanto la gama de colores como su textura, sabor y apariencia, ya que todos estos factores influyen enormemente en las ventas de los productos. Por este motivo, hoy en día existen muchos colorantes como aditivos en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, así como en las investigaciones biomédicas y de diagnóstico clínico. Entre los colorantes naturales, el azul es probablemente el mayor desafío ya que las fuentes naturales de este color son limitadas. Supone un gran reto sobre todo porque los consumidores, cuando tratan con este color, tienden a clasificarlo como “comida artificial”, alegando que no trae beneficios para la salud [93]. Sin embargo, el color azul es característico de

INTRODUCCIÓN

una de las ficobiliproteínas más importantes que es la ficocianina (PC). Ésta se usa en la industria cosmética y ya está aprobada como colorante alimentario [94].

La ficocianina se encuentra principalmente en la cianobacteria *A. platensis*, comúnmente llamada espirulina, como ya se mostró en la tabla 2. Generalmente, los altos contenidos en ficocianina que se encuentran en las cianobacterias están en torno a los 60-70 mg/g biomasa (contenido del 13% en peso seco) [95]. Otras fuentes naturales de este bioproducto son: *Gardenia jasminoides*, *Galdeira sulphuraria*, *Limnospira sp*, *Indigofera*, *Haslea ostrearia*, *Genipa americana* y *Allium* [50].

❖ Azul sintético vs. natural

Como ya se mencionó en el apartado 1.2.1 los colorantes azules sintéticos disponibles para la industria alimentaria deben reducirse, ya que algunos de ellos han demostrado ser peligrosos para la salud puesto que se han asociado con algunas enfermedades. Los colorantes azules sintéticos universalmente conocidos en esta industria son: E131 (azul patente V), E132 (índigo carmín) y E133 (azul brillante FCF). Existe un parámetro denominado dosis diaria aceptable (DDA) que representa la concentración más alta de una sustancia que no causa alteración adversa de la capacidad funcional, el crecimiento o el desarrollo del organismo y se expresa en mg por kg de peso corporal. La tabla 3 muestra los colorantes azules sintéticos aprobados junto con su DDA y los posibles efectos nocivos en la salud humana. Todo colorante sintético azul presenta un riesgo para la salud del consumidor si se consumen por encima de las dosis preestablecidas [96].

Tabla 3. Colorantes sintéticos azules, su dosis diaria aceptable (DDA) y los posibles efectos en la salud humana [96,97].

Colorante	DDA	Efectos en la salud humana
E131 Azul patente V	5 mg/kg·día	-Promueve reacciones alérgicas severas -Capacidad de bloqueo auriculoventricular
E132 Índigo carmín	2,5 mg/kg·día	-Promueve reacciones alérgicas severas -Hipotensión aguda severa -Puede causar isquemia cerebral.
E133 Azul brillante	6 mg/kg·día	-Potencial citotóxico y genotóxico en sangre humana. -Hipersensibilidad de reacciones en individuos susceptibles.

El colorante Azul patente V no mostró actividad mutagénica ni toxicidad. Normalmente es utilizado por los anestesiólogos para localizar los ganglios linfáticos, aunque hubo un estudio en el que veinte minutos después de la aplicación del colorante intravenoso, el paciente comenzó a

presentar una rápida frecuencia cardíaca [98]. Con respecto al colorante Azul brillante, también conocido como Azul 1, es un colorante soluble en agua, y que se suele aplicar en polvos lácteos, bebidas, dulces, condimentos y jarabes [97]. Teniendo en cuenta el conocimiento público de los posibles efectos que pueden ocasionar en la salud humana los colorantes sintéticos, los consumidores tendrán predisposición a evitar el consumo de dichos alimentos azules. Por ello, tanto la comunidad científica como la industrial se han esforzado por obtener fuentes de colorantes azules naturales. Los colores azules son típicos en la naturaleza, por ejemplo en la langosta, champiñones de patas azules, arándanos, queso azul, borraja y maíz [96].

Sigurdson y colaboradores [48] estudiaron la opción de obtener el colorante azul de las antocianinas. Las antocianinas de col lombarda muestran un color azul púrpura a pH de 5 a 7 y azul a pH 8. Sin embargo, observaron que después de 60 días a 23°C, el color azul desapareció por completo, mostrando una gran inestabilidad física. Por otra parte, la planta *Gardenia jasminoides* contiene la genipina iridoide incolora. Una vez se recupera, se pueden formar colorantes azules a través de reacciones con aminas primarias [99]. Aunque el color azul permaneció después de 10 h a 60-90°C, los compuestos azules formados deben verificarse para poder comprobar si tienen algún efecto adverso sobre el organismo humano [95]. Debido al desconocimiento de la composición química de este colorante, la FDA (“*Food and Drug Administration*”) estadounidense y la Unión Europea todavía no han aprobado su uso como colorante alimentario [96].

Por todo lo expuesto anteriormente, resulta muy interesante la ficocianina como fuente natural del color azul. A pesar del alto valor económico que presenta (llegándose a alcanzar precios comerciales de 33 \$/mg para el caso de la pureza de grado analítico [100]), su comercialización todavía continúa en desarrollo. Esto es debido a los altos costes de producción que rondan los 500 \$/kg [96]. Por ese motivo las etapas de extracción, separación y purificación de la misma, que se analizarán más adelante, son etapas claves para su obtención.

En los siguientes apartados se analizarán, en primer lugar, la estabilidad de dicho bioproducto, la bioactividad que presenta y los métodos de extracción separación y purificación de la misma.

❖ Estabilidad

La ficocianina es soluble en agua tibia y fría. Su solubilidad es máxima a un pH aproximado de 7, disminuyendo en condiciones ácidas. Por debajo de pH 3, el pigmento precipita inmediatamente debido a la desnaturalización de las proteínas [101]. Al ser una proteína, todos los factores que suelen afectar negativamente a la estructura de las proteínas también son desfavorables para el pigmento, como, por ejemplo: valor de pH bajo, fuerza iónica alta y temperatura elevada, entre otros. Generalmente, la ficocianina es poco estable a temperatura

ambiente pero se observó que a 0°C y a pH 7 presentaba una alta estabilidad física [102]. Por otro lado, este pigmento es inestable a la luz, concretamente, a la luz ultravioleta. Por todo lo mencionado anteriormente, se debe tener un control muy estricto en las condiciones de extracción, separación y purificación de la ficocianina.

❖ **Bioactividad**

La ficocianina posee propiedades neurológicas y nutracéuticas muy relevantes en la industria:

✓ Capacidad antioxidante

La respuesta metabólica al estrés oxidativo puede afectar a los componentes de las células, como proteínas, ácidos nucleicos y la propia membrana celular y, como consecuencia, puede causar numerosas enfermedades como diabetes, enfermedades cardiovasculares, inflamaciones, cáncer, enfermedades degenerativas, isquemia y anemia [103]. Para la prevención y tratamiento de estas enfermedades, ya se utilizan algunos fitoquímicos como α -tocoferol, ácido caféico, zeaxantina, etc. Además, Hirata y colaboradores sugirieron que la eficacia de las bilinas en las cianobacterias es similar a la de otros fitoquímicos teniendo un gran potencial para la actividad antioxidante para el caso de la ficocianobilina [104].

Al igual que los carotenoides, la ficocianina es capaz de eliminar los radicales libres de ROS (especies reactivas de oxígeno) [105] y neutralizar las moléculas reactivas, disminuyendo el nivel de oxidación. Concretamente, el estrés oxidativo puede dañar el ADN y puede conducir a la apoptosis o a la mutagénesis. Bhat y colaboradores [106] demostraron que tanto la ficocianina como la ficocianobilina son eficientes para eliminar el peroxinitrilo e inhibir el daño del ADN.

La ficocianina fue descrita por Datla en 2011 [107] no solo como un gran antioxidante sino también como un estimulante inmunológico y como un agente antiinflamatorio. Por otro lado, Cervantes y colaboradores [108] estudiaron el uso de la ficocianina como un agente neuroprotector en modelos de roedores con encefalomiелitis autoinmune, donde la ficocianina redujo el estrés oxidativo.

✓ Capacidad anticancerígena

El cáncer es una de las enfermedades que más problemas está generando a nivel mundial y también es una de las principales causas de muerte. Durante las últimas décadas, se han obtenido resultados muy positivos con productos naturales en forma de extractos y compuestos puros de plantas, algas, hongos y cianobacterias. Entre las ficobiliproteínas, la ficocianina ha sido estudiada también por su capacidad anticancerígena. En este sentido, presenta la ventaja de ser tóxica para las células cancerosas, bloqueándolas, inhibiendo su crecimiento y, en ocasiones, llegando a matarlas, pero sin afectar a las células sanas. Juega un papel muy importante para varios tipos de

INTRODUCCIÓN

células cancerosas, como las presentes en el cáncer de mama, de hígado, de pulmón, de colon, de médula ósea y en la leucemia [109]. Se ha analizado en muchas investigaciones el uso de dos o más combinaciones de medicamentos para tratar la enfermedad con el fin de mejorar el efecto terapéutico [110]. Cuando se combina la ficocianina con los medicamentos de quimioterapia, la dosis de los medicamentos puede reducirse y, por lo tanto, minimizar los efectos secundarios.

✓ Capacidad antiinflamatoria

El proceso inflamatorio, es muy común en la vida cotidiana de los humanos. Puede ser leve, como dolor muscular, o puede causar daños severos como es el caso de las lesiones pulmonares agudas, que se caracterizan por el daño a las células epiteliales y endoteliales de los pulmones [111]. En casos de enfermedades inflamatorias, la principal fuente de proinflamatorios es la inducción por macrófagos. La actividad antiinflamatoria de las ficobiliproteínas está relacionada principalmente con la acción de esta molécula que inhibe dichas señales proinflamatorias.

✓ Otras bioactividades

Li y colaboradores [111] publicaron que la ficocianobilina era capaz de disminuir la producción de ROS, y, como consecuencia, la ficocianina que la contiene, puede tener una importante aplicación en la terapia de enfermedades pulmonares. Además, inhibe el estrés oxidativo en los tejidos, de forma que puede actuar como agente preventivo de la diabetes y las cataratas [112].

También se ha observado que posee un efecto de anti-obesidad y que éste podría deberse a la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática [113] además Chakdar y colaboradores [114] informaron de que la ficocianina disminuyó el colesterol sérico, el total, los triglicéridos y las lipoproteínas de baja densidad.

Con respecto a su bioactividad como agente neuroprotector, se cree que la acumulación de fibrillas insolubles llamadas amiloides, que están implicadas en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, puede ser subsanada por la ficocianina. Se ha demostrado que la ficocianina interactúa con una sinucleína α , la cual es la responsable de la formación de fibrillas y esa interacción da como resultado una reducción en la cantidad de fibrillas formadas [115].

En otro trabajo se mostró que la ficocianina disminuía las lesiones hepáticas al reducir la actividad de las enzimas como las transaminasas hepáticas y la fosfatasa alcalina, que se activan por el estrés oxidativo [116].

1.2.5. Métodos de extracción

Existen numerosas técnicas para extraer ficocianina a partir de la biomasa de *A. platensis*. Su extracción resulta difícil ya que la pared celular de las cianobacterias es muy resistente. Dicha pared es análoga a la pared celular de las bacterias gramnegativas y está cubierta de fibrillas de proteínas, seguidas de una capa de peptidoglicano y una capa de fibrillas más interna [117,118], siendo el peptidoglicano el que contribuye principalmente a la rigidez de la pared celular [119]. Para favorecer esta extracción se requiere de una etapa de pretratamiento de la biomasa. Existen varios métodos de pretratamiento como los *métodos mecánicos*: homogeneización de alta presión [120], tratamiento con ultrasonidos [121], extrusión, molino de bolas, campos eléctricos pulsados [122]; *no mecánicos*: congelación/descongelación, shock osmótico; *químicos*: álcalis, disolventes, ácidos; y *biológicos*: digestión con lisozima [123], entre otros [50,117]. Tanto la pureza como la cantidad de ficocianina extraída dependen del método utilizado, ya que estos métodos pueden extraer una amplia gama de compuestos.

Normalmente estos métodos de disrupción celular se combinan entre sí o con la utilización de disolventes orgánicos para mejorar la eficiencia en la extracción de ficocianina [124], ya que utilizando únicamente los métodos convencionales se llega a extraer únicamente el 50-60% de la ficocianina total [125]. Pero son procesos que utilizan grandes cantidades de disolventes orgánicos, que no son medioambientalmente sostenibles y que utilizan equipos más sofisticados y recursos humanos especializados, que hacen muy difícil la comercialización rentable de la ficocianina [126]. Por este motivo, en las últimas décadas, la palabra “verde” ha adquirido un nuevo significado en campos relacionados con la química. En este contexto, se dio prioridad a la minimización de los impactos ambientales y de salud de los disolventes comúnmente utilizados en la industria. Debido a esto, surgen los líquidos iónicos como disolventes alternativos para la extracción de este compuesto de alto valor añadido (ver *apartado 1.2.7*). A continuación, se explican brevemente alguno de los métodos de disrupción celular convencionales más utilizados en las industrias.

❖ Homogeneización

De los métodos que existen la homogeneización a alta presión es una tecnología no térmica que consiste en someter un fluido a presiones altas (50-400 MPa) para que fluya continuamente a través de una válvula de paso muy estrecho (micras). Ese fluido acelerado impacta contra el anillo de la válvula lo que genera una despresurización instantánea con la consiguiente cavitación, aumento del esfuerzo cortante y generación de ondas de choque, que promueven la lisis celular y la difusión de los componentes celulares en el disolvente de extracción [127].

Con respecto a la aplicación de esta técnica en las microalgas, de igual forma, se aplica principalmente a la ruptura de la pared celular, concretamente, para la recuperación de lípidos para la producción de biodiesel [128] y para la extracción de proteínas y pigmentos solubles en agua.

❖ **Congelación - descongelación**

El método de congelación y descongelación se define como el método más simple pero el más eficiente. Es ampliamente utilizado para la extracción de ficocianina en cianobacterias marinas y de agua dulce [129]. Para el caso concreto de *A. platensis*, experimentalmente se ha observado que, suspendiendo la biomasa en tampón fosfato 0.1 mM a pH 6,8 y, congelando y descongelando dicha disolución durante cuatro ciclos, proporciona una cantidad de ficocianina extraída de 73,73 mg/g (referido a biomasa seca) [125].

Se han encontrado varios inconvenientes en los métodos de extracción anteriormente mencionados, tales como, largos tiempos, formación de hielo, etc. Para solventar estos problemas se planteó el uso del ultrasonido y de este modo, acelerar la disrupción celular [130]. Concretamente, tanto Moraes y colaboradores [130] como Sánchez-Laso y colaboradores [131] afirmaron que el tratamiento con ultrasonidos tiene un 57% más de eficiencia que el método de congelación – descongelación. El objetivo principal para la selección de un método de extracción óptimo es conseguir extraer la máxima cantidad de ficocianina junto con su capacidad antioxidante, pero esto depende principalmente de la naturaleza de dicho compuesto y de su estabilidad térmica. Para el caso concreto de la ficocianina, que es un compuesto bioactivo muy sensible al calor, habrá que tener especial cuidado con las extracciones realizadas con métodos que empleen temperaturas más altas, ya que pueden dañar la calidad del extracto [132].

❖ **Tratamiento con ultrasonidos**

El tratamiento con ultrasonidos o extracción asistida por ultrasonido (US o UAE) es un proceso en el que una onda de ultrasonido con una frecuencia de entre 18-200 kHz pasa a través de un medio líquido que produce ciclos de rarefacción y compresión. Gracias al ciclo de rarefacción, se forman microcavidades (microburbujas) que crecen hasta un determinado tamaño y colapsan rápidamente durante el ciclo de compresión, mediante el denominado efecto de cavitación. Durante el colapso se pueden generar temperaturas de entre 1000-10000 K y presiones de 100-1000 bar. Los efectos físicos generados por las ondas de ultrasonido ayudan a la extracción de pigmentos ya que provocan la ruptura de la pared celular [133] y facilitan una mayor difusión de los disolventes al interior celular.

Este tipo de proceso ofrece la posibilidad de reducir el tiempo de extracción y los productos químicos empleados, lo que hace que el proceso de extracción de pigmentos sea más económico. Ha sido ampliamente estudiado para la extracción de ficocianina de la cianobacteria

A. platensis, [132]. En dicho estudio, Hadiyanto y colaboradores analizaron el efecto de la frecuencia de ultrasonidos, 28 kHz y 42 kHz, en la extracción utilizando etanol como disolvente. Se obtuvieron rendimientos del 15,97% y 11,24%, respectivamente. Se observó que el tiempo requerido para el tratamiento con ultrasonidos era significativamente menor (20 minutos) que para el proceso convencional de extracción, que suele requerir de un tiempo de 4 horas. Por ello, es un proceso que puede ser económicamente más rentable ya que se reducen los costes energéticos debido a la disminución de los tiempos de operación. Otra de las ventajas que presenta es que es fácilmente implementable a gran escala para aplicaciones industriales [134,135]. De igual forma, numerosos autores han informado del uso de la UAE en la extracción de ficobiliproteínas para distintas especies de microalgas [121,136].

Al igual que en otros procesos, el tratamiento con ultrasonidos se puede emplear individualmente o en combinación con otros procesos, dependiendo de las características de la microalga de estudio y del pigmento que se quiera extraer. El paso crucial para una extracción eficiente de ficocianina es la selección de la combinación óptima de la técnica de extracción junto con el disolvente utilizado.

1.2.6. Disolventes de extracción

❖ Disolventes convencionales vs. disolventes “verdes”

Como ya se ha mencionado, la mayoría de estos procesos de extracción utilizan disolventes orgánicos [96,137]. En la extracción líquido-líquido, que es uno de los métodos clásicos para extraer numerosos compuestos, el procedimiento consiste en poner en contacto dos fases líquidas inmiscibles, una de las cuales contiene el compuesto de interés, mientras que la otra es una fase orgánica (disolvente de extracción) en la que se deben disolver selectivamente los compuestos objetivo [138]. El etanol, el metanol, la acetona, el acetato de etilo, el hexano, o sus mezclas con agua (en el caso que sean miscibles), son los agentes de extracción más utilizados para este tipo de procesos. El etanol se utiliza principalmente para la extracción de compuestos altamente hidrófilos que comprenden compuestos polares neutros, ácidos y básicos, azúcares, aminoácidos, nucleótidos y polisacáridos; mientras que para extraer compuestos moderadamente hidrófobos (alcaloides, ácidos grasos, esteroides, etc.) se utiliza acetato de etilo. De acuerdo con Herrero y colaboradores [139] el disolvente más adecuado para la extracción de ficocianina es el etanol ya que presentaba una mayor efectividad que el hexano o el agua.

El uso de los disolventes orgánicos debe reducirse, debido a que la mayoría de ellos son dañinos, tóxicos y ambientalmente perjudiciales [140], y su uso presenta riesgos tanto para la salud de los seres humanos como para el medio ambiente [141]. Por esa razón, se ha de prestar especial atención a la naturaleza de los compuestos que se van a aislar o extraer, como es el caso de los pigmentos, que pueden estar destinados a la alimentación o como agente antioxidante en el

INTRODUCCIÓN

campo de la medicina y la cosmética. Por ello, los disolventes orgánicos no son la opción más recomendable para cumplir con las restricciones legislativas vigentes (Directiva 2009/32/CE) [142].

Debido a esta problemática, en estos últimos años ha cobrado mucho significado la palabra “verde”; es decir, se deben utilizar disolventes alternativos renovables y que generen extractos seguros y de alta calidad. Por ello, Naciones Unidas definió un nuevo plan de desarrollo centrado en la sostenibilidad que consiste en 17 objetivos sostenibles, reconociendo, entre otros, las necesidades de una química e ingeniería sostenibles. El principal objetivo de la química verde es reducir el uso de sustancias peligrosas, como dichos disolventes orgánicos y, al mismo tiempo, reducir el consumo de energía y promover el uso de fuentes renovables [140].

Este concepto se formuló por primera vez a principios de la década de 1990 y, en un esfuerzo por guiar a los investigadores hacia este objetivo, Anastas y Warner publicaron los 12 principios de la química verde [143], que se muestran en la figura 13 junto con los 6 principios de la extracción verde introducidos por Farid Chemat [144].

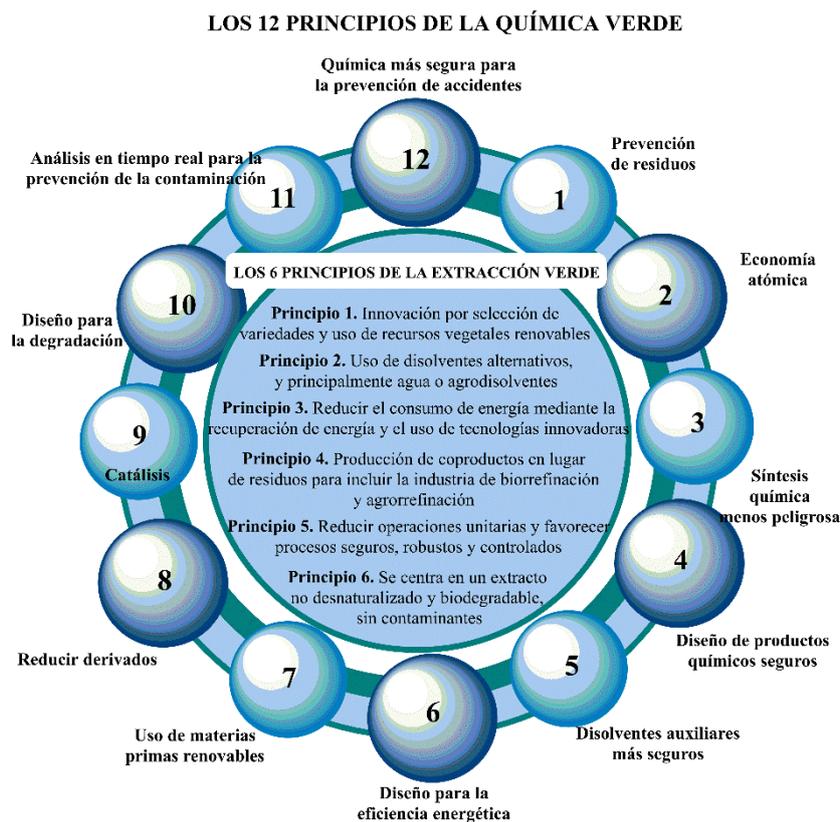


Figura 13. Los doce principios de la química verde [145] y los seis principios de la extracción verde de productos naturales. Adaptación de [144].

Dentro de este marco, en los últimos años, se han propuesto disolventes más sostenibles y ambientalmente viables como alternativa a los disolventes convencionales, siendo no tóxicos,

INTRODUCCIÓN

reciclables, biodegradables y con un bajo coste energético en su síntesis. Entre ellos, los líquidos iónicos, los disolventes eutécticos y los disolventes de base biológica han recibido mucha atención debido a sus características tan atractivas. Los disolventes verdes se pueden agrupar en las siguientes categorías (tabla 4) [146].

Tabla 4. Categorías de disolventes verdes junto con sus respectivas ventajas y desventajas [146]

Clasificación	Ventajas	Desventajas
Disolventes neotéricos	Extracción de triglicéridos, colorantes naturales, aromas y polifenoles	
Líquidos iónicos	Presión de vapor despreciable Estables térmicamente a T > 200°C Solubilidad excepcional para sustancias orgánicas, inorgánicas y organometálicas	Valores de viscosidad medios-altos Algunos son caros Problemas de toxicidad no esclarecidos por completo
Disolventes eutécticos profundos	Facilidad de preparación Capacidad de solubilización de diversos compuestos con poca solubilidad en agua Bajo coste, biodegradable	Viscosidad alta en comparación con muchos disolventes orgánicos convencionales Problemas de toxicidad no esclarecidos por completo
Fluidos supercríticos	Viscosidad adaptable Descafeinado de té y café, extracción de lecitina del aceite	
Agua supercrítica	Renovable Sin problemas de toxicidad	Altos requerimientos energéticos en los procesos de separación y reutilización Problemas de oxidación del equipo
Dióxido de carbono supercrítico	No hay riesgos con el uso de disolventes orgánicos Barato, inodoro, no tóxico, renovable A nivel industrial fácil su reciclaje	Requiere alta presión Poca capacidad para disolver especies polares e iónicas Altos costes del mantenimiento de equipos
Disolventes de base biológica	Extracción de pigmentos y antioxidantes	
Etanol	Fácil de recuperar Solubilidad apreciable de compuestos orgánicos en estado supercrítico	Incremento neto de emisiones Inflamable, potencialmente explosivo y de naturaleza corrosiva
Glicerol	Extracción de polifenoles Incoloro, de sabor dulce y biodegradable Estabilidad química en el almacenamiento Disolvente de alto punto de ebullición	Altos costes operativos y de inversión
Terpenos	Extracción de grasas y aceites Facilidad de recuperación y reutilización Biodegradables No inflamables	Baja polaridad Alta volatilidad
Disolventes supramoleculares	Extracción de alcaloides, compuestos bioactivos, eliminación de pesticidas, tensioactivos y colorantes	La extracción de solutos de muestras sólidas no muy explorado

En este escenario, los líquidos iónicos (LIs) aparecen como una alternativa prometedora para la extracción de ficobiliproteínas debido a sus propiedades versátiles como disolventes

verdes, tales como la baja volatilidad y su no inflamabilidad, entre otras [147,148]. Algunos estudios previos han demostrado resultados prometedores en la extracción de ficobiliproteínas, concretamente, en la extracción de ficocianina, combinando los líquidos iónicos junto con tecnologías emergentes como las aplicaciones asistidas por microondas y ultrasonidos [131,147,148]. De este modo, se propone una ruta más económica en comparación con otros procesos dependientes del calor [149,150].

A pesar de las excelentes capacidades que aportan en estos procesos, es necesario evaluar la toxicología y la sostenibilidad de ellos, ya que son importantes para la comercialización y marketing de las tecnologías que se ven impulsadas principalmente por el uso de dichos líquidos iónicos.

1.2.7. Líquidos iónicos

1.2.7.1. Definición, características, estructura, ventajas y aplicaciones

Los líquidos iónicos son sales que, generalmente, se encuentran en estado líquido a temperaturas inferiores a 100°C [151].

En las últimas dos décadas, la investigación en el campo de los líquidos iónicos ha ido en constante aumento y ha tenido un gran impacto, surgiendo así, tecnologías muy prometedoras [152]. Desde su descubrimiento inicial en 1914 por Paul Walden [153] se han utilizado tanto para fines académicos como industriales y son candidatos potenciales para resolver algunos de los principales problemas a los que la sociedad se enfrenta hoy en día. Emergieron como un recurso alternativo limpio, eficiente y ecológico a los disolventes orgánicos convencionales. Tienen muchos beneficios significativos debido a sus propiedades térmicas, físicas, químicas y biológicas. Además, son muy versátiles puesto que pueden modificarse en función de su aplicación, variando su composición (combinación de cationes y aniones).

❖ Estructura de los líquidos iónicos

La estructura molecular de los líquidos iónicos consta de diferentes cationes y aniones. El catión suele estar formado por un compuesto orgánico (con carga positiva), mientras que los aniones (con carga negativa) tienen un volumen mucho menor que los cationes y su naturaleza es inorgánica. Debido a esa asimetría de la estructura, es decir, a la diferencia de tamaño entre aniones y cationes, el enlace entre los dos componentes de los líquidos iónicos es débil y por ello estos compuestos son líquidos a temperaturas relativamente bajas.

La estructura del líquido iónico es similar a la de una sal, pero en ésta, el fuerte enlace entre el catión y su anión (son parecidos en tamaño, carga y naturaleza) hace que la estructura de la sal sea cristalina y su punto de fusión suele ser elevado (>800°C). Los dos grupos principales

INTRODUCCIÓN

de líquidos iónicos son aquellos en los que el catión está formado por un compuesto orgánico derivado del imidazol o del piridinio (figura 14).

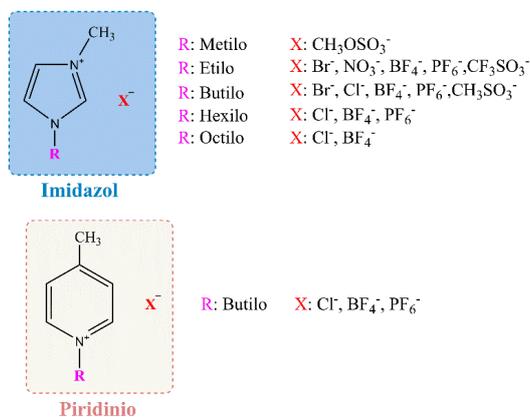


Figura 14. Líquidos iónicos con los cationes imidazol y piridinio (modificado de [154]).

Se pueden utilizar distintos aniones y cationes para sintetizar diferentes líquidos iónicos con distintas propiedades fisicoquímicas mejoradas. En la figura 15 se muestran los cationes y aniones más comúnmente utilizados [155].

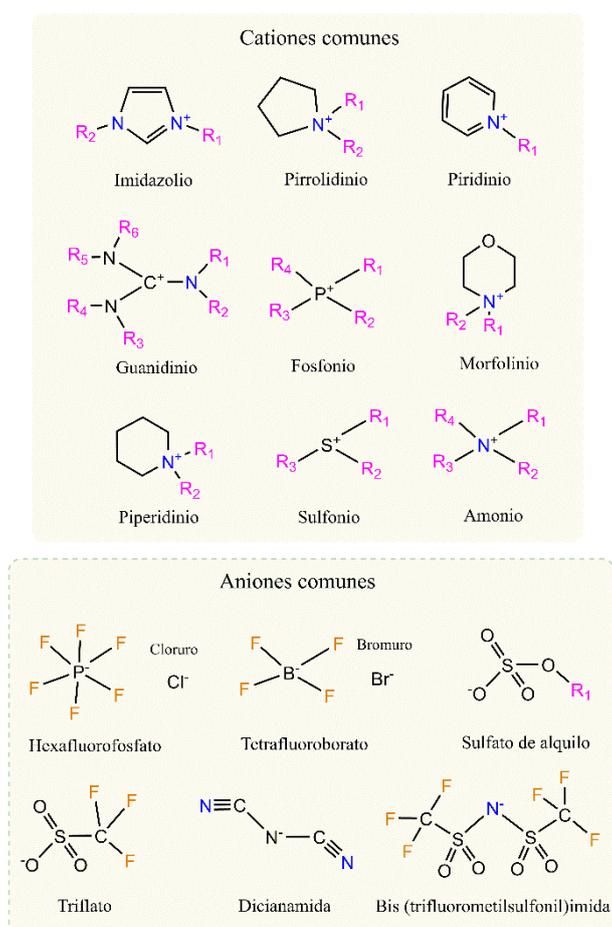


Figura 15. Cationes y aniones comunes en los líquidos iónicos (modificado de [155,156]).

❖ Nomenclatura

Aunque la mayoría de los LIs pueden identificarse simplemente nombrando los constituyentes catiónicos y aniónicos de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC, es más útil un enfoque del tipo abreviatura. Para nombrarlos de forma esquemática, se indican los iones entre corchetes. Una de las formas es el sistema propuesto por Welton y Hallet [157,158] para describir los LIs de forma esquemática.

Este sistema emplea un código alfanumérico en el que la letra C se usará para referirse a las diferentes cadenas alquílicas enlazadas, tanto al catión como al anión y un subíndice numérico que indicará el número de átomos de carbono de estas. Para describir el grupo, generalmente aromático, sobre el que se encuentra la carga de los cationes, se usará una abreviatura alfabética; de esta forma:

- “*Im*” se empleará para referirse a cationes de tipo imidazolio.
- “*Py*” se usará para referirse a cationes de tipo piridinio.
- “*Pyr*” se usará para referirse a cationes de tipo pirrolidinio.
- “*Morph*” se usará para referirse a cationes de tipo morfolinio.
- “*Pip*” para cationes piperidinio
- “*P*” para fosfonio.

La posición de las cadenas alquílicas se indicará con un superíndice, entendiéndose que se encuentran unidas al heteroátomo. De esta forma el catión 1-etil-3-metilimidazolio se denotará como $[C_2C_1Im]^+$ y el catión 1-etil-3,5-dimetil-2-pentilpiridinio se nombrará como $[C_2^1C_1^3C_1^5C_5^2Py]^+$. Con el uso de esta nomenclatura lo que se intenta conseguir es expresar una mayor claridad y rigurosidad en el trabajo y hacer la lectura de este mucho más sencilla.

❖ Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas influyen en el uso de los líquidos iónicos como disolventes en las técnicas de extracción. Se analizarán dichas propiedades y las estructuras químicas de los cationes y aniones de los LIs correspondientes [159].

Punto de fusión

El punto de fusión se ha definido como una propiedad compleja, que refleja las fuerzas intramoleculares y la disposición de la red cristalina. Para los LIs comerciales el punto de fusión puede oscilar entre -82°C a 280°C [159,160]. Esto es así porque los LIs cubren una amplia gama de puntos de fusión y, aunque, sus puntos de fusión suelen ser inferiores a 100°C , también pueden no ser líquidos a temperatura ambiente. Por lo tanto, es necesario introducir una clasificación

INTRODUCCIÓN

adicional para los LIs: *Líquidos iónicos a temperatura ambiente* (RTIL), que son sales con el punto de fusión por debajo de 100°C.

Las diferencias significativas existentes en los puntos de fusión de las sales inorgánicas ordinarias y los LIs surgen de las diferencias en sus estructuras cristalinas. La estructura asimétrica presente en los LIs es el factor principal que impide el proceso de cristalización y conduce a valores bajos de temperatura de fusión. Como ejemplo de sal inorgánica está el NaCl que tiene un punto de fusión de 884°C mientras que para un líquido iónico como el [C₄C₁IM][BF₄] el punto de fusión es de -82°C. Dentro de los LIs el parámetro más importante y que afecta enormemente al punto de fusión es la longitud de la cadena alquílica. Para el caso concreto de los LIs basados en imidazolio, el aumento de la longitud del sustituyente, independientemente del tipo de anión hace que el punto de fusión de dicho LI disminuya [159].

Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de los LIs es un parámetro muy importante ya que limita la temperatura máxima de funcionamiento. El principal indicador que caracteriza la estabilidad térmica de los LI es la temperatura de descomposición.

Entre los LIs, hay una gran proporción de ellos que tienen una alta temperatura de descomposición. Esto les permite ser utilizados como disolventes de reacción a temperaturas elevadas. Su estabilidad térmica varía entre los 200 y los 400°C y depende tanto del anión como del catión. Con respecto al catión, la influencia de la longitud de la cadena alquílica en la estabilidad térmica se puede explicar de la siguiente manera [161]: un aumento en la longitud de la cadena alquílica debilita el enlace entre la cadena alquílica y el catión (como el imidazolio y el amonio), por eso, térmicamente, se descompone más fácilmente [162].

De forma general, atendiendo al catión, la temperatura de descomposición de los líquidos iónicos sigue el siguiente orden: fosfonio > imidazolio > amonio [159,163].

Densidad

La densidad disminuye según aumenta la temperatura y es una de las propiedades más importantes para cualquier fluido. La densidad de los líquidos iónicos se encuentra en el intervalo 1,05-1,35 g/cm³, siendo mayor que la densidad del agua y que la de la mayoría de los disolventes orgánicos [164]. Desde el punto de vista analítico, la selección de un disolvente adecuado es muy importante para todas las técnicas de extracción, ya que dicho disolvente debe tener una densidad superior a la del agua para una fácil separación de la fase de extracción después de la centrifugación.

INTRODUCCIÓN

Tanto las fuerzas intermoleculares como la masa de los elementos presentes en el compuesto están relacionadas directamente con la densidad. Sin embargo, para los líquidos iónicos, debido a su compleja estructura, no es fácil encontrar una correlación directa entre su estructura y esta propiedad. La densidad de los LIs depende de la longitud y del tipo de sustituyentes del catión y del tipo de anión.

De forma general, las densidades de los LIs aumentan con el aumento en la longitud de la cadena de aniones, para un mismo catión [165]. Esto se puede atribuir al aumento de las fuerzas de Van der Waals entre los iones constituyentes, de forma que, se produce un acercamiento de los aniones a los cationes y así ocuparán de forma eficiente los espacios generados por los cationes voluminosos. Con respecto a la estructura del catión, se puede decir que afecta a la densidad de los LIs de un modo similar, disminuye al aumentar el volumen del catión o al aumentar la longitud de la cadena alquílica del éste [165,166]. Esto se debe a que el aumento del volumen del catión genera más espacios en su disposición molecular.

Viscosidad

La viscosidad está directamente relacionada con el coeficiente de difusión y es un parámetro crucial en todas técnicas de extracción. Depende tanto de las interacciones ion-ion, como de las fuerzas de Van der Waals y de los enlaces de hidrógeno, de forma que con mayores interacciones se tienen mayores viscosidades [167].

En general, los líquidos iónicos tienen una viscosidad elevada, mayor que la de los disolventes orgánicos moleculares convencionales. La viscosidad de los LIs depende del tipo de catión y anión, variando ampliamente en un rango de 10 a 10^5 cP, a presión atmosférica y 20°C. Mientras que la viscosidad de los disolventes orgánicos está comprendida entre los rangos de 0,2-10 cP [159]. Asimismo, la viscosidad en los líquidos iónicos presenta una gran dependencia de la temperatura [168] y también se ve afectada por la presencia de impurezas.

Los parámetros determinantes de la viscosidad son el tamaño del anión y la basicidad de éste. Aunque la influencia del catión en la viscosidad no es muy grande, se ha observado que un aumento en la longitud de la cadena alquílica del catión del tipo imidazolio supone un aumento en los valores de viscosidad. De forma general, las viscosidades de los LIs aumentan conforme aumenta la longitud de la cadena alquílica. Esto se atribuye al hecho de que al aumentar la longitud de la cadena alquílica aumentarán las interacciones mediante fuerzas de Van der Waals y por ello, la viscosidad [169].

Volatilidad y presión de vapor

A diferencia de las sales fundidas, los LIs son sales formadas por iones muy asimétricos y de gran tamaño. Las fuerzas atractivas catión-anión son más débiles que en las sales

convencionales, por lo que estas sustancias presentan una presión de vapor muy baja o indetectable [170]. Esto los hace fácilmente manejables y, al no evaporarse, permite la utilización de ciertas técnicas de separación, como la destilación para la recuperación de productos o sustratos disueltos en ellos. Con respecto a su volatilidad cabe destacar que es baja, con lo que los LIs son unos disolventes alternativos prometedores a los disolventes orgánicos.

❖ **Ventajas de los líquidos iónicos**

Dentro de los disolventes neotéricos, los líquidos iónicos han despertado gran interés como sustitutos potenciales de los disolventes orgánicos convencionales en la extracción de compuestos bioactivos de fuentes naturales [171,172]. En primer lugar, la naturaleza no volátil de los mismos hace que sean ideales en comparación con otros disolventes orgánicos como el etanol y el metanol, que son muy inflamables. En segundo lugar, algunos LIs tienen una baja viscosidad, lo que resulta enormemente ventajoso para cualquier LI destinado a gran escala en aplicaciones industriales, ya que la baja viscosidad del fluido facilita las operaciones de bombeo y agitación y reduce el consumo de energía [173]. Además, la baja presión de vapor junto con la baja tasa de emisión que presentan hace que sean seguros de usar a gran escala, reduciendo así la exposición de los operadores de planta [174]. Esto también se traduce en una menor contaminación, ya que se liberarán menos LI al medio ambiente. Por último, también presentan una alta estabilidad química y térmica, una alta conductividad iónica, son selectivos, y, por lo general, tienen una baja toxicidad y una gran capacidad de solubilizar varios compuestos orgánicos e inorgánicos [175].

En cuanto a su uso, como algunos LIs son inmiscibles en agua (formación de sistemas bifásicos) pero solubles en especies orgánicas, son disolventes adecuados para la extracción de una gran variedad de compuestos bioactivos [176,177]. Se han aplicado también para extraer antioxidantes de subproductos agroalimentarios, como el tirosol de las aguas residuales de los molinos de aceite, la naringina de las cáscaras de pomelo y los carotenoides de la cáscara del camarón [178] y la piel de naranja [179]. Además, siguiendo los principios de la química verde, la extracción de compuestos bioactivos mediante LIs combinados con tecnologías de extracción innovadoras ha ido adquiriendo mayor relevancia en los últimos años.

Actualmente, se han estudiado numerosos métodos de extracción que utilizan LIs. Aunque cabe la posibilidad de hacer una disolución directa de la biomasa de las microalgas para extraer sus compuestos intracelulares, la mayoría de las veces se utiliza una fuerza externa adicional para ayudar al proceso de extracción. Así surgen, como ya se había mencionado con anterioridad, los métodos combinados con LIs. Dentro de estas combinaciones se pueden utilizar: microondas, ultrasonido, campos eléctricos pulsados y molienda con esferas, de esta forma se genera una fuerza adicional para intensificar el proceso de extracción. Estos métodos se

desarrollaron principalmente para trabajar sobre la dura pared celular de las microalgas que está siendo un obstáculo para la completa utilización de compuestos derivados de las mismas. En este sentido, se ha demostrado que el uso de líquidos iónicos en combinación con los métodos tradicionales reduce el tiempo de extracción en un 92% [180].

❖ Aplicaciones de los líquidos iónicos

Los primeros líquidos iónicos fueron sintetizados con fines electroquímicos, para ser usados como electrolitos a baja temperatura [181]. Si se comparan con los electrolitos convencionales los LIs poseen similares potenciales electroquímicos y conductividades iónicas, y también son más seguros ya que son menos tóxicos e inflamables. Tal y como se muestra en la figura 16, los LIs iónicos se utilizan en diferentes equipos electroquímicos, como por ejemplo en baterías [182], placas solares [183] y condensadores electroquímicos [184]. Estos nuevos disolventes también presentan una gran utilidad como medios de reacción tanto en procesos químicos como bioquímicos, lo que ha potenciado el desarrollo de nuevos líquidos iónicos. Por ello, se han podido emplear en reacciones nucleofílicas y electrofílicas catalizadas por complejos de metales de transición.

Recientemente, los esfuerzos de investigación y aplicación de los LIs se han focalizado en procesos de separación y purificación [185]. Los LIs son capaces de extraer de forma selectiva un compuesto específico de una mezcla gaseosa o líquida [186] y también son capaces de formar sistemas bifásicos acuosos que pueden utilizarse para la extracción o separación de varios compuestos, como se verá más adelante en el *apartado 1.2.8.2*.

Durante los últimos años, los LIs se han empleado para síntesis y catálisis química, procesos de polimerización, aplicaciones electroquímicas, reacciones de hidrogenación, aplicaciones analíticas (en columnas de cromatografía de gases y en soportes para microscopía electrónica de barrido (SEM)) tal y como se muestra en la figura 16.

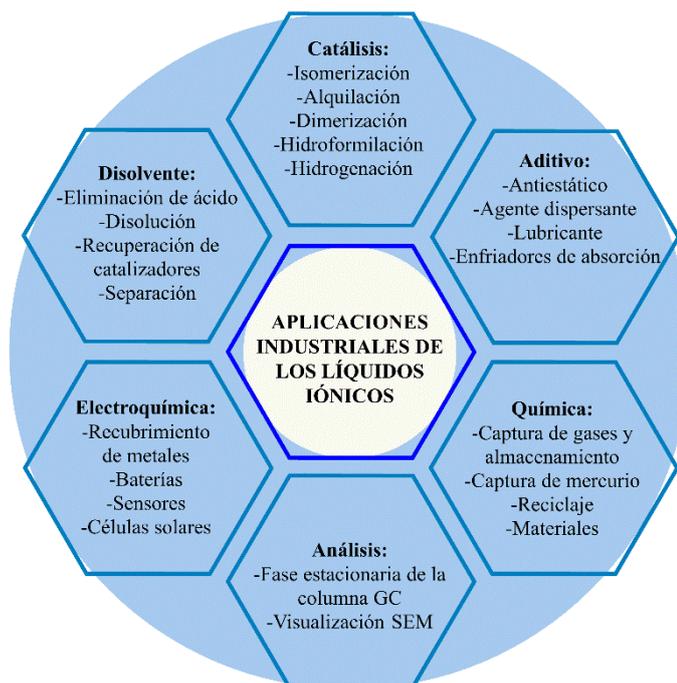


Figura 16. Aplicaciones de los líquidos iónicos (modificado de [155])

1.2.7.2. Clasificación

Los LIs se pueden clasificar en dos grandes categorías, los líquidos iónicos apróticos (AIL), o convencionales, y los líquidos iónicos próticos (PIL), o sales de Brönsted. La diferencia entre ambos es su forma de obtención y su estructura química. La mayoría de las investigaciones sobre líquidos iónicos se han orientado hacia los líquidos iónicos apróticos, principalmente aquellos basados en el catión 1,3-alquilimidazolio, $[C_nMIM]^+$, y aniones como el $[PF_6]^-$, $[(CF_3SO_2)_2N]^-$, $[BF_4]^-$ y $[Tf_2N]^-$ [181,187]. Algunos ejemplos de líquidos iónicos próticos son: acetato de 2-hidroxi-dietilamonio (2-HDEAA), acetato de 2-hidroxi-etilamonio (2-HEAA) y formiato de 2-hidroxi-etilamonio (2-HEAF) [188,189].

❖ Líquidos iónicos apróticos o convencionales

La síntesis de estos LIs generalmente se lleva a cabo mediante la cuaternización (alquilación) de un imidazol (o amina) correspondiente, seguida de una reacción de intercambio iónico (Figura 17). Esta reacción de intercambio iónico puede ser por un tratamiento directo de las sales del haluro con ácidos de Lewis o reacciones de metátesis aniónica [181]. En algunos casos el catión se encuentra disponible comercialmente, por lo tanto, solo se requiere el intercambio aniónico. Estos líquidos iónicos no tienen protones intercambiables, es decir, no tienen protones activos en su estructura química, esto es la razón por la que se denominan líquidos iónicos apróticos [190].

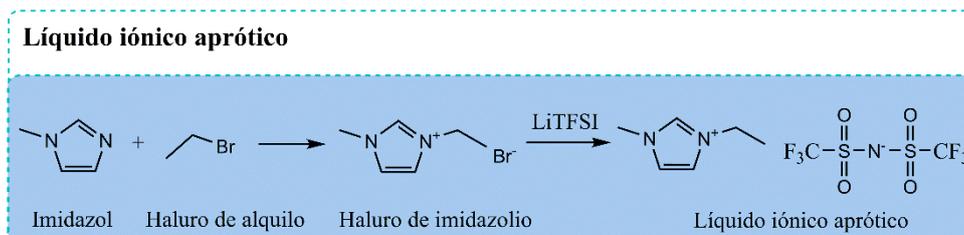


Figura 17. Síntesis típica de los líquidos iónicos apróticos (modificado de [190]).

La reacción de metátesis consiste en el intercambio de iones en una disolución que contiene dos pares iónicos, para dar como resultado el par de iones termodinámicamente más estable. En un principio, y, desde hace muchos años, el esfuerzo investigador se ha orientado hacia los líquidos iónicos apróticos, grupo al que pertenecen los líquidos iónicos empleados en este trabajo. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado un creciente interés en los líquidos iónicos próticos ya que tienen un modelo de síntesis química más sencillo, y menor coste de producción.

❖ Líquidos iónicos próticos o sales de Brönsted

Por otro lado, los LIs próticos son aquellos que contienen un protón ácido en el catión y se obtienen por medio de una transferencia de protón entre un ácido de Brönsted y una base del mismo tipo. De esta manera se origina, al menos, un protón capaz de promover enlaces de hidrógeno. Estos LIs se sintetizan por reacción directa y en proporciones estequiométricas. Para ello, se utilizan compuestos de amina o fosfina con el ácido correspondiente al anión deseado (figura 18).

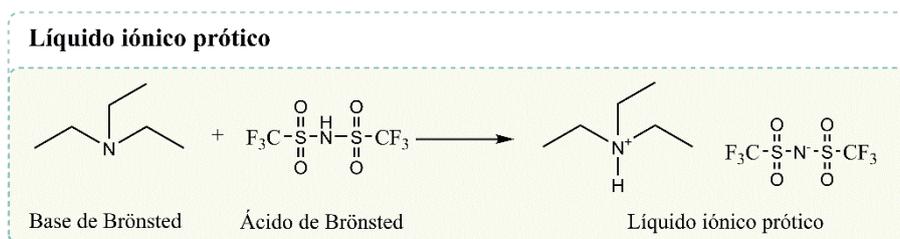


Figura 18. Ejemplo de síntesis de un líquido iónico prótico (modificado de [190]).

1.2.7.3. Actuación del líquido iónico

Hasta la fecha, los estudios sobre la disrupción celular de la biomasa de microalgas se han centrado principalmente en los líquidos iónicos apróticos y, concretamente, en los basados en imidazolio. Esto puede deberse, a su mayor disponibilidad comercial, así como a su gran capacidad para disolver la celulosa, el componente principal de las paredes celulares de las microalgas [191]. Orr y colaboradores [191] estudiaron el efecto de distintos LIs (imidazolio, amonio, fosfonio...) sobre la eficiencia de extracción de lípidos de *Chlorella vulgaris*. Este estudio concluyó que, tanto en términos de lisis celular como en cantidad de aceite extraído, los

INTRODUCCIÓN

LIs con mejores resultados fueron el [C₂MIM][EtSO₄] (etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio), de la familia imidazolio y el [C₄m_βpy]Br (bromuro de 1-butil-3-metilpiridinio) de la familia piridinio. Existe un líquido iónico análogo a uno de los LIs más efectivos encontrados en el anterior estudio, el [C₄m_βpy]Cl, que es conocido por su gran capacidad para disolver celulosa, al igual que el [C₂MIM][Cl] que puede disolverla hasta en altas concentraciones [192,193]. Aunque el [C₂MIM][EtSO₄] demostró tener una gran capacidad de lisis celular, no hay muchas referencias bibliográficas al respecto.

De esta forma, se puede deducir que la disolución de celulosa puede que no sea el único mecanismo de acción para la ruptura de la pared celular de las microalgas. Esto es posible ya que la composición de la pared celular de las microalgas varía mucho entre especies e incluso entre diferentes cepas de la misma especie y, además de celulosa, puede contener hemicelulosa, glucosaminas, lípidos y proteínas [194]. Como las proteínas forman parte de la pared celular, al solubilizarse estas en los líquidos iónicos, podría verse alterada la integridad celular y provocar la ruptura celular.

Por otro lado, si se analiza el efecto que tiene la cadena alquílica en la ruptura celular y en la solubilidad de la ficocianina, se puede afirmar que los líquidos iónicos que tienen cadenas alquílicas más largas son más hidrofóbicos, mientras que los LIs con cadenas alquílicas más cortas son hidrófilos, por lo que estos son más afines a las ficobiliproteínas (ficocianina) y las solubilizan mejor [195].

De forma general, la solubilidad de las proteínas se suele referir a disoluciones acuosas o mezclas de agua con varios cosolventes. Aunque es posible disolver aminoácidos y proteínas en líquidos iónicos, se prefieren las mezclas acuosas debido a la mayor solubilidad y/o mayor estabilidad de la biomolécula, así como la reducción de costes [196]. Debido al carácter anfifílico de las proteínas, el agua y los iones de los líquidos iónicos interactúan con áreas de la superficie de las proteínas, que pueden ser polares o no polares, tal y como se muestra en la figura 19.

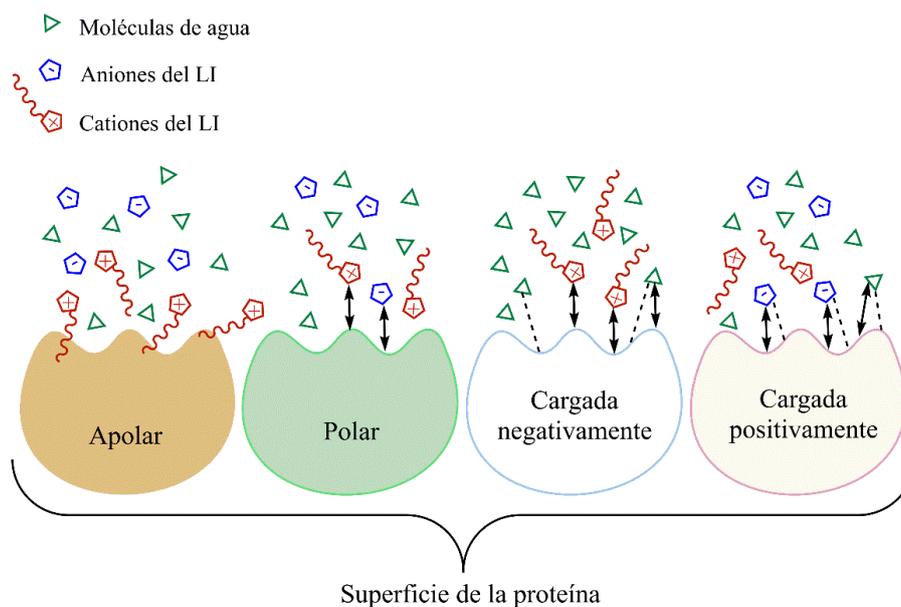


Figura 19. Interacciones de las especies disolventes con la superficie de la proteína. Los enlaces de hidrógeno se representan mediante líneas discontinuas y las interacciones electrostáticas mediante flechas (modificado de [196,197]).

Otro aspecto a tener en cuenta en la disolución de proteínas es el carácter fuerte anfífilico de la mayoría de los cationes de los LIs. Como se puede apreciar en la figura 19, para el caso en el que la superficie de la proteína sea apolar, las largas cadenas de alquilo unidas al “centro de carga” generan regiones apolares con mayores interacciones de dispersión, que son de gran importancia [198].

En el caso de que la superficie de la proteína sea polar, como los cationes de los LIs también son especies cargadas, compiten con los aniones por sitios de solvatación favorables en la superficie polar de la proteína. En este caso, la mayoría de las cadenas alquílicas catiónicas están orientadas hacia fuera de la superficie de la proteína [199]. Por supuesto, los aminoácidos cargados negativamente atraen más cationes que aniones, pero todavía competirían con las moléculas de agua (triángulos verdes), que pueden formar enlaces de hidrógeno con los aminoácidos de la superficie, en contraste con los cationes, que presentan una fuerte interacción de Coulomb.

El acercamiento de cationes a la superficie de la proteína cargada positivamente no se excluye puesto que las densidades catiónicas de la carga son bajas y también es permitida por los aniones cercanos a la superficie de la proteína.

1.2.7.4. Toxicidad y biodegradabilidad

Los líquidos iónicos son conocidos por ser una alternativa limpia a los disolventes orgánicos convencionales, principalmente debido a su casi nula presión de vapor. Para poder emplearles de forma segura como disolventes es necesario conocer su toxicidad y su

INTRODUCCIÓN

biodegradabilidad. Aunque estos datos no están desarrollados para todos los LIs, su baja volatilidad hace reducir las potenciales vías de exposición, quedando así el contacto directo con la piel y la ingestión como únicas vías posibles.

La gran mayoría de los LIs que se han estudiado son irritantes y tienen una toxicidad comparable con la de los disolventes orgánicos convencionales. No obstante, numerosos trabajos han demostrado que es posible sintetizar LIs no tóxicos seleccionando de forma adecuada el catión y el anión correspondientes. De forma general y, gracias a análisis biológicos, se ha demostrado que la toxicidad de los LIs viene determinada fundamentalmente por el tipo de catión. Se pueden utilizar distintos microorganismos para evaluar la toxicidad de los LIs como son las bacterias *Aliivibrio fischeri*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y la levadura *Candida albicans* [200].

Concretamente la bacteria más estudiada es *A. fischeri*, una bacteria marina bioluminiscente gramnegativa, siendo el bioensayo toxicológico basado en la bioluminiscencia que produce este microorganismo el más ampliamente utilizado. Este análisis se basa en la relación entre el metabolismo celular de *A. fischeri* y su luminiscencia, lo que permite relacionar la disminución de la intensidad de la luz con la toxicidad del medio al que está expuesta. Presenta una fácil interpretación, alta sensibilidad y una buena relación calidad/coste en comparación con otros ensayos [200]. Montalbán y colaboradores [201] midieron la toxicidad de veintinueve LIs (basados en imidazolio, piridinio y amonio), concluyendo que los LIs basados en piridinio presentan una toxicidad más alta que los similares basados en imidazolio. Recientemente, Delgado-Mellado y colaboradores [202] y Kusumahastuti y colaboradores [203] realizaron un trabajo similar. El primero se centró en la ecotoxicidad de 24 líquidos iónicos a base de imidazolio y piridinio con *A. fischeri* concluyendo de igual forma, que los LIs basados en piridinio conducen a una mayor toxicidad y que la longitud de la cadena alquílica catiónica tuvo una mayor influencia en la toxicidad del LI, mientras que el anión tiene una influencia mucho menor. En el segundo trabajo se evaluó el efecto de la cadena de alquilo, y se verificó que la longitud de esta era responsable de la toxicidad de los LIs y que conforme aumenta ésta, aumenta la toxicidad. De esta forma, los líquidos iónicos con cadenas alquílicas más cortas en el catión, presentan menores toxicidades y aquellos con cadenas alquílicas mayores de C₁₀ se consideran tóxicos.

Como se ha visto, aunque no se puede afirmar que los LIs sean totalmente “verdes”, sí que se puede corroborar que los procesos químicos en los que se emplean estos nuevos disolventes presentan grandes beneficios medioambientales al reducir la generación de residuos (eliminando las pérdidas del disolvente por evaporación y mediante la reutilización de los LIs) y el consumo de energía, ya que en la recuperación de los productos se elimina la etapa de evaporación de disolvente.

1.2.7.5. Recuperación y reutilización de los líquidos iónicos

Durante las últimas décadas se han realizado numerosos esfuerzos para intentar recuperar y reutilizar los LIs, de esta forma, aunque el coste del proceso de producción asociado a los LIs sea alto, la recuperación y reutilización de ellos supone una opción económica interesante [204]. Estos procesos incluyen la destilación [205], la adsorción [206], la separación por membrana [207], la extracción acuosa bifásica [208], la diálisis [131,209], etc. Entre estos métodos, la destilación, la extracción y la diálisis por membrana son los más usados.

La destilación, especialmente la llevada a cabo a vacío, se suele emplear como etapa final para la separación de los productos más volátiles de los LIs. Sin embargo, cuando hay sustancias no volátiles o que sean térmicamente sensibles, la opción más adecuada es la extracción. Por otro lado, la adsorción se considera una forma estable y no destructiva para recuperar los LIs de una disolución acuosa, aunque la investigación de la desorción de los LIs todavía continúa en desarrollo.

Durante los últimos años, los procesos que utilizan membranas; como la diálisis, empleada en la presente tesis doctoral, han sido ampliamente utilizados para la recuperación y purificación de sustancias aprovechando la permeabilidad selectiva de las membranas. Para la recuperación de LIs también se han utilizado este tipo de membranas [131]. Una de las ventajas de este proceso es su bajo consumo de energía y el modo de operación sencillo.

De igual forma, existen diversas técnicas de separación por membrana que resultan prometedoras para separar y recuperar los LIs, tales como por ejemplo, la microfiltración (MF) [210], nanofiltración (NF) [211] y ósmosis inversa (OI) [212], que son técnicas impulsadas por presión. Otro tipo de separación por membrana es la pervaporación (PV) que consiste en una membrana no porosa y densa, en la que, en un lado, se hace vacío mientras que, en el otro lado de la membrana, que está en contacto con la fase líquida, se mantiene a presión ambiental. El soluto volátil se divide preferentemente en la membrana, cuya fuerza motriz es el gradiente de potencial químico. Normalmente este proceso se suele utilizar para separar LIs de mezclas [213].

1.2.8. Separación y purificación de ficocianina

Como se ha mencionado con anterioridad, la ficocianina tiene una alta demanda debido a sus propiedades farmacológicas, como sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios, entre otros y debido también a su gran uso potencial como colorante alimentario para chicles y como principio activo cosmético. Se estima que para el 2027 la ficocianina tendrá un valor de mercado global de 245,5 millones de US\$ [214]. Este bioproducto se comercializa de acuerdo con su grado de pureza, por lo que se divide en cuatro grados de pureza según sus potenciales aplicaciones [215,216]. La pureza de PC (P_{PC}) se calcula como la relación entre las absorbancias a 615 nm y 280 nm, que se corresponden con el máximo de absorbancia de la PC y el máximo de absorbancia

INTRODUCCIÓN

de las proteínas totales, respectivamente (*ver apartado 3.2.2*). Por ello, una mayor pureza de PC implica que en dicho extracto purificado ha disminuido el contenido en proteínas totales. Dependiendo del valor numérico obtenido de esta relación se clasifican los distintos grados de purezas:

-Grado 1 ($P_{PC} = 0,7-1,5$): grado de alimentación, usado como colorante en la industria alimentaria.

-Grado 2 ($P_{PC} = 1,5-2,5$): grado cosmético, se utiliza como colorante en la industria cosmética.

-Grado 3 ($P_{PC} = 2,5-3,5$): nivel de reactivo, utilizado como biomarcador en aplicaciones biomédicas.

-Grado 4 ($P_{PC} > 4$): grado analítico, con aplicaciones terapéuticas y en biomedicina.

El coste de la ficocianina de grado alimenticio es de alrededor de 0,13 US\$/mg, mientras que el grado analítico puede tener un valor económico muy alto, aproximadamente de 33 US\$/mg [100]. Debido a esto, la mayor parte de las veces es necesario incluir alguna o varias etapas de separación y purificación de la PC, y, de esta forma, se alcanza un grado de pureza mayor, ya que probablemente el extracto crudo de ficocianina no llegará a alcanzar el grado alimenticio.

1.1.8.1. Métodos convencionales

La separación y purificación de proteínas y, por ende, de ficocianina, es el cuello de botella en el campo de la biotecnología porque las técnicas tradicionales de purificación de proteínas (por ejemplo: electroforesis, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular o precipitación con sulfato de amonio) requieren mucho tiempo y dinero [217]. Desde hace años, otra técnica como la extracción líquido-líquido o, comúnmente denominada, sistema bifásico acuoso muestra resultados muy prometedores. Esta técnica de fraccionamiento ha generado mucho interés debido al gran potencial para la extracción, separación y purificación de proteínas, membranas, virus, enzimas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas tanto en la industria como en el mundo académico [218]. Aunque el comportamiento de reparto involucrado en el método es complejo y difícil de predecir, la investigación desarrollada durante años muestra que se ha utilizado con éxito, por ejemplo, en la detección de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos, separación de metales preciosos, tratamiento de aguas residuales, y en la separación de ficocianina [219]. Este sistema es capaz de dar un alto rendimiento de recuperación, es fácilmente escalable, y es económica y ambientalmente viable.

A continuación, se muestran las técnicas tradicionales de separación y purificación de ficocianina más utilizadas.

❖ **Cromatografía de intercambio iónico**

La cromatografía de intercambio iónico es una de las técnicas más utilizadas para la purificación de proteínas y otras biomoléculas. Se basa en la interacción electrostática entre una fase estacionaria y los solutos. Se han desarrollado varios medios de cromatografía de intercambio catiónico y aniónico para la purificación de proteínas.

La retención de los solutos, en la cromatografía de intercambio iónico, generalmente se logra con fuerzas iónicas bajas (20-50 mmol/L) [220]. Para una mejor capacidad de separación los valores de pH deberían estar entre 0,5-2 unidades de diferencia respecto del punto isoeléctrico de la molécula objetivo. La elución de dicha molécula se suele lograr mediante un gradiente salino creciente, utilizando generalmente NaCl [221]. A altas concentraciones de sal, los iones de la sal compiten con las biomoléculas en la unión con los ligandos cargados y, por tanto, se eluyen las biomoléculas objetivo que previamente habían sido retenidas. La ficocianina, en concreto, eluye entre concentraciones de 0,1 y 0,2 M de NaCl [221]. También se puede realizar la elución por cambio de pH, pero se usa con menos frecuencia ya que esto puede implicar cruzar los puntos isoeléctricos de las proteínas y provocar la precipitación.

Chen y colaboradores [222] desarrollaron una extracción y separación de ficocianina a partir de *A. platensis* en un solo paso, utilizando cromatografía de intercambio iónico en un lecho fluidizado. La biomasa se pretrató con ultrasonidos y, tras el proceso de separación y purificación de la ficocianina se alcanzó una pureza de 3,0, con una recuperación de un 59%.

❖ **Cromatografía de exclusión por tamaño**

La cromatografía de exclusión por tamaño también se conoce como filtración en gel o cromatografía de tamiz molecular. La separación en este proceso se basa en la diferente capacidad de las moléculas objetivo para entrar en los poros del medio de filtración de gel, debido a su tamaño molecular diferente [223]. La fase estacionaria en este tipo de técnica consiste en partículas de un material hidratado que tiene una distribución definida del tamaño de poro, de forma que las moléculas atraviesan esta fase estacionaria por diferentes caminos según su tamaño. Cuando una disolución acuosa, que contiene distintas moléculas con diferentes tamaños moleculares, pasa a través de una columna rellena con dichos “tamices moleculares”, las moléculas de mayor tamaño se desplazan rápidamente a través de la columna mientras que las moléculas más pequeñas ingresan en los poros del gel y avanzan más lentamente, lo que conduce a un mayor tiempo de retención (figura 20) [224].

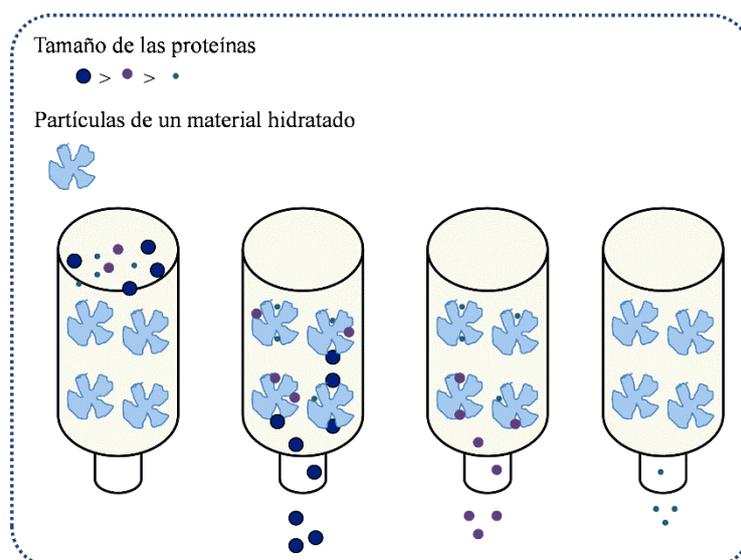


Figura 20. Separación progresiva de moléculas con diferente tamaño molecular por filtración en gel. Elaboración propia.

Con esta técnica las moléculas se eluyen en orden decreciente de tamaño molecular. La masa molecular de la molécula más pequeña incapaz de penetrar en los poros del gel se dice que es el “límite de exclusión” de dicho gel.

Para la separación y purificación de ficocianina en numerosas ocasiones se utiliza tanto la cromatografía de intercambio iónico como la cromatografía de exclusión molecular o una combinación de ambas, obteniendo resultados muy prometedores [225].

❖ **Precipitación con sulfato de amonio**

La precipitación con sulfato de amonio es un método conocido para la purificación de proteínas. Este método consiste en añadir dicha sal a una solución acuosa que contiene las proteínas de interés. La sal se disocia y el agua, que anteriormente ofrecía un gran poder solvatante a las proteínas, solvata preferentemente a los iones disociados. Por ello, las cargas de las moléculas de proteína tienden a interactuar mucho más, formando agregados y precipitando, a este efecto se le denomina “*salting out*”. Además, el sulfato de amonio suele elegirse para este propósito debido a su alta solubilidad en agua y su bajo coste [226,227]. Esta etapa de precipitación con sulfato de amonio presenta muchas ventajas frente a otros agentes precipitantes, ya que evita la desnaturalización de las proteínas por las bajas temperaturas de solubilización y su efecto bacteriostático [228], por ese motivo, en este trabajo, es una de las etapas elegidas para la purificación de ficocianina.

En este tipo de método se han llevado a cabo numerosos esfuerzos para optimizar algunos parámetros experimentales como, por ejemplo, la concentración, el volumen y el pH del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la purificación de ficocianina a partir de la biomasa de *A. platensis* [229].

INTRODUCCIÓN

A continuación, se presentan en la tabla 5 las principales ventajas y desventajas de los métodos de separación y purificación de proteínas descritos anteriormente. Cabe destacar que los métodos cromatográficos se utilizan ampliamente a escala de laboratorio. Por otro lado, las tecnologías basadas en el fraccionamiento bifásico convencional (sistemas de dos fases acuosas, que se muestra a continuación en el *apartado 1.2.8.2*) a pesar de ser escalables, demandan grandes cantidades de compuestos químicos, generando problemas ambientales. Por ello, la incorporación de los LIs a esta tecnología resulta bastante interesante.

Tabla 5. Principales ventajas y desventajas de los métodos de separación y purificación de biomoléculas [226,230]

Métodos de Separación/Purificación	Ventajas	Desventajas
Cromatografía de intercambio iónico	-Aplicable para varias biomoléculas -Altos niveles de pureza con alta eficiencia	-Respuesta condicionada a la interacción entre soluto, eluyente y sitios activos de la resina
Cromatografía de exclusión por tamaño	-Fácilmente escalable -Tiempos cortos de análisis -Separación bien definida -Se requieren pequeñas cantidades de fase móvil -No hay pérdida de muestra	-Grandes volúmenes de eluyente -Baja resolución -Baja selectividad comparada con otras técnicas cromatográficas
Precipitación con sulfato de amonio	-Tecnología de bajo coste -Factible para gran escala	-Se suele utilizar como método de pre-purificación, seguido por métodos cromatográficos o filtración por membrana para lograr altos niveles de pureza

1.2.8.2. Sistemas de dos fases acuosas (ATPS)

En 1896, Martinus Beijerinck descubrió, de forma accidental y por primera vez, el sistema bifásico o sistema de dos fases acuosas (ATPS) [218], observando la formación de dos fases inmiscibles al disolver almidón y gelatina en agua. Sin embargo, su aplicación real fue descubierta por Per-Åke Albertsson que propuso un sistema ATPS para concentrar o aislar diferentes tipos de materiales biológicos [231]. Esta técnica surge de la necesidad de sustituir a los disolventes orgánicos en la extracción líquido-líquido para la extracción y separación de biomoléculas. Desde entonces estos sistemas han ganado la atención en un gran número de áreas, como la industria alimentaria, la síntesis química y la ingeniería biomédica [232].

En particular, la separación de biomoléculas hacia las dos fases inmiscibles, ha provocado que el sistema ATPS se use en diversas aplicaciones convencionales, tales como la extracción, la separación y purificación de orgánulos celulares [233], proteínas [231], nanotubos de carbono [234] e iones metálicos [235]. Esto es debido a sus enormes ventajas, ya que es ambientalmente viable, de bajo costo, capaz de operar de forma continua, fácilmente escalable y útil para una gran variedad de condiciones [236,237]. Concretamente, en el caso de las microalgas, este método ha sido seleccionado para la extracción de productos naturales de interés comercial como

carotenoides, ácidos grasos, proteínas, carbohidratos y otros compuestos [238] que tienen numerosas aplicaciones industriales, como aditivos alimentarios, antioxidantes, cosméticos o biofertilizantes.

❖ **Definición, tipos de sistemas ATPS y diagramas de fase**

El sistema de dos fases acuosas (ATPS) es un método de fraccionamiento líquido-líquido. Se basa en la incompatibilidad de dos soluciones acuosas que, a una determinada concentración, alcanzarán un equilibrio y se diferenciarán dos fases inmiscibles entre las que se distribuirán los solutos de interés, dependiendo de su afinidad hacia cada una de ellas [239]. Estas dos disoluciones pueden ser de distintos tipos, dando lugar a diferentes sistemas: polímero/sal (por ejemplo, polietilenglicol (PEG) y fosfato de potasio) [240], polímero/polímero (PEG/dextrano) [241], líquido iónico/sal [242] y alcohol de bajo peso molecular y una sal [243]. De forma general, la presencia de agua que caracteriza a estos sistemas crea un medio adecuado y apropiado para algunas biomoléculas, como las proteínas, los anticuerpos y las enzimas.

Debido a la capacidad de ajuste de los LIs (cubren un amplio rango de hidrofobicidad-hidrofilicidad [244]), el estudio del sistema ATPS basado en un sistema sal (LI)/sal (inorgánica u orgánica) ha crecido exponencialmente, en la figura 21 se pueden observar los más representativos. En particular, a partir de 2009, se han caracterizado y aplicado una gran cantidad de diagramas de fase como posibles plataformas de separación de una amplia gama de compuestos [245].

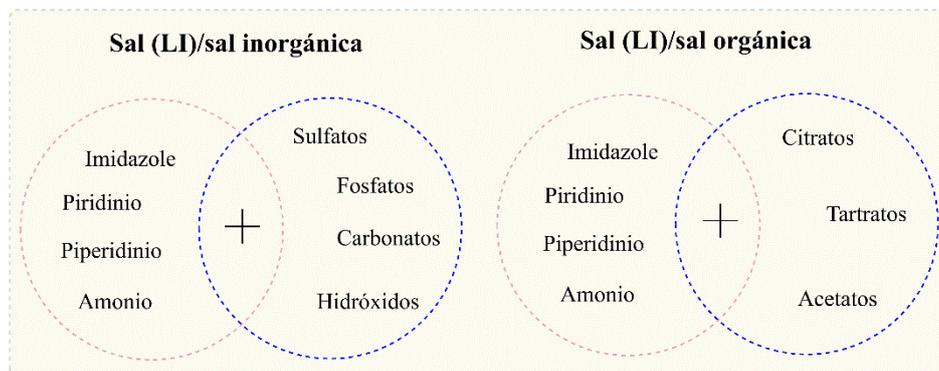


Figura 21. Ejemplos de sistema sal (LI)/sal (inorgánica u orgánica) ATPS.

Desde su inicio en 2003, el sistema acuoso de dos fases basado en líquidos iónicos se ha usado en la separación de proteínas y, concretamente en la separación y purificación de ficocianina [219]. Dada la naturaleza “verde” de los LIs, la funcionalidad de los sistemas LI-ATPS puede diseñarse de una forma óptima para adaptarse a los requerimientos específicos exigidos por el campo de la bioseparación. Generalmente, se han utilizado líquidos iónicos basados en el catión imidazolio porque durante muchos años se ha demostrado el efecto

INTRODUCCIÓN

estabilizador que tienen en las proteínas [197]. Aparte de estos líquidos iónicos, la investigación también se ha extendido al uso de otras familias de cationes de LIs (amonio, fosfonio...) y aniones (ácidos carboxílicos, aminoácidos, etc.) [242].

Los sistemas ATPS son sistemas ternarios formados por agua y dos solutos que son solubles en la misma. Aunque ambos componentes son solubles en agua, cuando se alcanza el equilibrio, se produce la separación de las dos fases, y cada fase se enriquecerá en uno de los dos componentes. Por ejemplo, en el caso de sistemas ATPS basados en LI/sal, la fase superior será rica en LI y la fase inferior será rica en sal [246]. Para poder identificar qué puntos de mezcla se pueden utilizar como plataformas de separación líquido-líquido es necesaria su caracterización. Esto se consigue elaborando un diagrama de fases (denominado también curva de solubilidad o curva binodal), el cual divide la región bifásica (por encima de la curva de equilibrio) de la región monofásica (por debajo de la curva) [245] (figura 22).

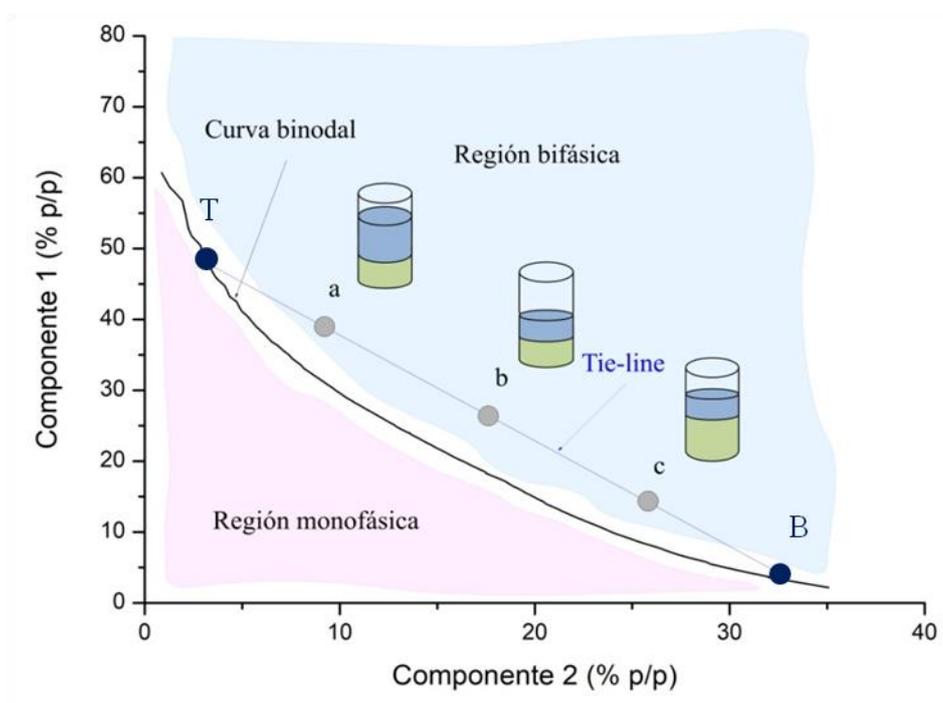


Figura 22. Esquema de un diagrama de fase ternario compuesto por el componente 1, componente 2 y agua, en % peso (% p/p), y la respectiva curva binodal junto con la recta de reparto ("tie-line"). "a, b y c" representan composiciones totales de tres sistemas que se encuentran en la misma tie-line con diferentes proporciones de volúmenes. La composición final de la fase superior e inferior es representada por T y B, respectivamente.

Elaboración propia.

Como se aprecia en la figura 22 cada punto de mezcla dentro de la zona bifásica tiene su propia recta de reparto o "tie line" que conecta dos puntos de la curva binodal (T y B), esos dos puntos corresponden a la concentración final de los componentes 1 y 2 en las fases superior e inferior, respectivamente. Una vez se ha elegido un punto de mezcla en el diagrama de fase (por ejemplo "b") se pueden seguir las tie lines para encontrar la composición de las dos fases

formadas. El punto más alto de intersección con la curva binodal (T) corresponde a la composición de la fase superior mientras que la intersección inferior (B) corresponde a la composición de la fase inferior. Esto significa que moviéndose a lo largo de la *tie-line*, las coordenadas denotan sistemas con diferentes composiciones totales al igual que distintas relaciones de volúmenes (a, b y c) pero la composición final de cada fase es la misma [232].

❖ **Construcción de las curvas binodales. Método del punto de niebla**

Como detalla Hatti-Kaul [232], las curvas binodales se pueden construir principalmente mediante tres métodos diferentes: 1) método de valoración turbidométrica, 2) método del punto de niebla/turbidez (“*Cloud Point*”) y 3) método de determinación del nodo (puntos finales) de todos los sistemas. Los métodos más comunes son los métodos de titulación (turbidimétricos y del punto de niebla). Para la elección del método específico se debe considerar el tipo y la naturaleza de los agentes formadores de fase. Por ejemplo, la determinación de las curvas de solubilidad para un sistema ATPS del tipo sal (LI)/sal puede llevarse a cabo fácilmente mediante el método del punto de turbidez [244], pero si se utilizan algunos polímeros polidispersos en un sistema ATPS polímero/polímero o polímero/sal, puede ocurrir que se produzca un aumento o decrecimiento gradual de la turbidez, lo que afectaría negativamente a la precisión de este método [232,245].

Respecto al método del punto de enturbiamiento o método del *Cloud Point*, de forma muy resumida, consta de dos pasos principales [244,247]:

- I. Adición gota a gota de una solución acuosa de sal a una disolución acuosa de líquido iónico (o líquido iónico puro) hasta la detección visual de una solución turbia y bifásica. Se anota el peso de la disolución de sal añadida.
- II. Adición gota a gota de agua ultrapura hasta la formación de una solución clara y transparente, correspondiente al régimen monofásico. Se anota el peso del agua añadida.

Ambos pasos se repiten sucesivamente y, de esta manera se van obteniendo los distintos puntos de equilibrio que conformarán la curva binodal del sistema (se explicará más detalladamente en el procedimiento experimental *apartado 3.1.2*). La composición de los sistemas siempre se determinó mediante cuantificación en peso.

❖ **Reparto de proteínas en el sistema LI-ATPS**

La formación de un sistema ATPS basado en líquido iónico y sal se induce cuando se ponen en contacto una disolución de LI y una disolución concentrada de sal, de esta forma se forma una fase superior rica en LI, y una fase inferior rica en sal, ambas acuosas [208,248].

INTRODUCCIÓN

La separación de fases se puede controlar por la distinta naturaleza de las propiedades del enlace de hidrógeno que poseen ambas fases. Por lo tanto, se entiende que la separación de fases es solvofóbica y que está impulsada por atracciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas [249]. Los sistemas ATPS basados en LIs se pueden ajustar para mejorar la solubilidad y, por tanto, la eficiencia de extracción y las propiedades de reparto y, de igual forma, mejorar la velocidad de la separación de las fases. Los LIs basados en imidazolio *C_n-metil-imidazolio*, donde n= 2, 4, 6 y 8, son los que se describen más frecuentemente en bibliografía, junto con otros núcleos de imidazolio funcionalizados [208].

Se ha demostrado que los sistemas LI-ATPS son ampliamente utilizados para separar proteínas de carbohidratos. Pei y colaboradores [248] fueron los pioneros en la aplicación de sistemas LI-ATPS para la separación selectiva de proteínas de una mezcla contaminada con polisacáridos. Descubrieron que el 82,7-100% de la proteína, en este caso, la albúmina de suero bovino (BSA), migró a la fase superior, mientras que los carbohidratos se concentraron preferentemente en la fase inferior [248,250].

Por ello, durante muchos años, se han realizado numerosos esfuerzos en investigación para clarificar qué fuerzas impulsoras son las que permiten el reparto de las proteínas preferentemente a la fase superior, rica en LI, en un sistema LI-ATPS. Dreyer y colaboradores [251] afirmaron que el peso molecular y la carga neta de las proteínas son los factores más importantes que explican el enriquecimiento de las proteínas en la fase rica en LI.

De forma que, el modelo sugerido para describir el comportamiento del reparto de las proteínas en un sistema LI-ATPS se basa en las interacciones electrostáticas entre los residuos de aminoácidos cargados negativamente en la superficie de la proteína, y el catión del LI (cargado positivamente) [252]. Éstas son las fuerzas impulsoras para la extracción preferente de las proteínas en la fase rica en LI (figura 23).

INTRODUCCIÓN

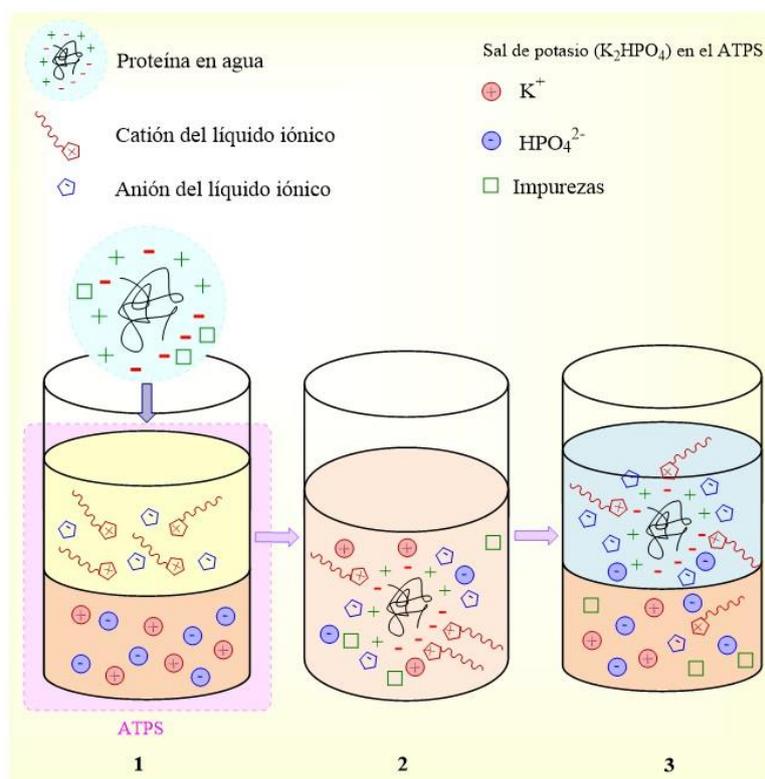


Figura 23. Descripción de las fuerzas impulsoras en el reparto de proteínas en un ATPS basado en LI (adaptado de [252]).

Como se aprecia en la figura 23 en el paso 1 se produce la adición de la proteína de estudio al sistema LI-ATPS, a continuación (paso 2) se homogeniza el sistema y, por último (paso 3), se deja el sistema LI-ATPS en reposo para que se alcance el equilibrio y se produzca la formación de las dos fases. En la fase superior, rica en LI, se concentra preferentemente la proteína objetivo, y en la fase inferior, rica en sal, las impurezas.

Es posible adaptar el sistema para la separación de diferentes proteínas cambiando el pH del sistema. El modelo de estudio estaría basado en un sistema ATPS con un pH de 6,5-7,0. Este pH es superior al punto isoelectrico de dos proteínas modelo como, por ejemplo, Rubisco (pI \approx 5,5) [253] y BSA (pI \approx 4,7) [254], lo que implica que ambas proteínas están cargadas negativamente en el sistema ATPS [238]. Por ello, las interacciones electrostáticas entre la proteína cargada negativamente y el catión del LI influyen positivamente en la concentración de la proteína en la fase rica en LI.

Para el caso concreto de la ficocianina el punto isoelectrico suele estar entre 4,1-4,3 [109,255] aunque este valor puede variar dependiendo del método de extracción y purificación [256]. De igual forma, como se ha visto para el caso de Rubisco y BSA para poder separar a la ficocianina de los carbohidratos, se ha de disponer de un sistema LI-ATPS con un pH de 6,5-7,0. En ese rango de pH, la PC es estable y, además, el pH es superior al punto isoelectrico con lo que

la PC estaría cargada negativamente y por ello, la afinidad por el LI la concentraría en la fase superior preferentemente.

❖ **Influencia de factores en el ATPS y en el reparto de proteínas**

Los diagramas de fase del sistema ATPS pueden verse influenciados por muchos parámetros, incluidos el tipo y la concentración de los componentes que forman las fases, la temperatura, el pH y la presencia de aditivos o contaminantes. Sin embargo, los que representan una mayor influencia sobre el mecanismo de separación de las fases son la temperatura y el pH [245].

De forma general, a medida que aumenta la temperatura, las curvas binodales ya sean del tipo polímero/polímero o sal (LI)/sal cambian a concentraciones más altas para la formación de fases, es decir, provocan una disminución en la región bifásica [244]. Por el contrario, el ATPS basado en polímero/sal tiene un comportamiento opuesto al aumentar la temperatura, ya que a medida que ésta aumenta, se produce un aumento en la región bifásica y, por consiguiente, se requiere menos polímero y/o sal para que se produzca la separación de las fases [257]. Como se ha visto, la temperatura afecta en gran medida a la composición de las dos fases en un sistema ATPS y, por ende, al diagrama de fases. Estos cambios de temperatura también afectan al reparto a través de la densidad y la viscosidad. Por lo tanto, se recomienda tener un control estricto de la temperatura en los experimentos relacionados con el sistema ATPS.

El efecto del pH en la separación de fases de ATPS del tipo polímero/sal y sal (LI)/sal ha sido estudiado en numerosos trabajos. Los diagramas de fase a pH creciente provocaron una ampliación de la región bifásica, por ello, se requiere menor cantidad de los componentes formadores de fase (polímeros o sales) para la formación del sistema bifásico [257,258]. Sin embargo, rara vez se ha estudiado el efecto del pH en los diagramas de fase para el tipo de ATPS polímero/polímero. Yan y colaboradores [259] demostraron que la curva binodal para dos polímeros sensibles al pH se acerca al origen (aumento de la región bifásica) cuando el pH disminuye. Como se ha visto anteriormente, el pH del sistema ATPS puede alterar la carga y las propiedades superficiales del soluto, lo que afectará al reparto de la biomolécula entre ambas fases. La carga neta de la proteína objetivo será negativa en el caso de un pH superior al punto isoeléctrico (pI) y positiva si es inferior. Si el pH es igual al pI, la carga neta será cero [233]. También se ha demostrado que el reparto de biomoléculas cargadas negativamente en un sistema a pH más alto aumenta el coeficiente de partición y la biomolécula objetivo tiene mayor afinidad por la fase superior.

Dado que el mecanismo de reparto en el sistema ATPS continúa en desarrollo, ya que no se conoce por completo, la mayoría de los ATPS están optimizados de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de las biomoléculas.

❖ Aplicaciones del sistema ATPS

Durante la última década, se han publicado aproximadamente 100 artículos anuales basados en aplicaciones de los sistemas ATPS [237]. Estos trabajos científicos se centraron en la separación y purificación de enzimas, proteínas, purificación de ADN, ácidos nucleicos, anticuerpos monoclonales y antibióticos, aunque también hubo varios que abordaron la extracción de metales. De entre todas las aplicaciones mencionadas, destacan principalmente la aplicación de estos sistemas en el campo de la separación y purificación de proteínas.

Generalmente, en términos económicos, las etapas de purificación y separación de biomoléculas, en este caso, de proteínas, tienen un impacto muy relevante, ya que su procesamiento requiere numerosos pasos ya que se suele tener como partida un material complejo [237]. Por ese motivo, la demanda para la creación de un método económico, con alto rendimiento y eficiente, en la purificación de proteínas, ha ido aumentando considerablemente a lo largo del tiempo.

La cromatografía de proteínas no es un método adecuado para aplicar a gran escala debido al funcionamiento de este proceso por cargas, y a las grandes pérdidas de presión. Los sistemas acuosos formados por disolventes orgánicos, no se consideran adecuados para la purificación de proteínas debido a la baja solubilidad que éstas presentan en ellos, y tampoco son sostenibles medioambientalmente. Para poder superar todas estas limitaciones se han propuesto los sistemas LI-ATPS, que han representado un gran interés en su aplicación a gran escala para la recuperación de proteínas a partir de materias primas crudas estos últimos años [232]. En este proceso, la mayor parte de las proteínas se concentran en la fase superior del sistema, que, convencionalmente, está formada por PEG (polietilenglicol) y, en los últimos años, por LIs.

Cabe destacar, especialmente, la extracción de proteínas de la orina mediante esta técnica para el diagnóstico de varias enfermedades, por ejemplo, la diabetes mellitus. En 2007, Wang y colaboradores [260] reportaron por primera vez el uso de sistemas LI-ATPS para la extracción de proteínas de la orina humana. Utilizaron un ATPS que contenía un LI basado en imidazolio ([BMIM][Cl]) y una sal (K_2HPO_4). La proteína se extrajo en la fase superior, rica en LI mientras que los contaminantes se separaron en la fase inferior, rica en sal.

Para el caso concreto de la ficocianina, ficobiliproteína objetivo de la presente tesis doctoral, se han aplicado también estos sistemas LI-ATPS, concretamente LIs del tipo imidazolio, obteniendo resultados prometedores [219], esto supone un avance hacia el desarrollo en este campo para poder llevarlo a escala industrial.

1.3. Bioenergía

1.3.1. Situación energética actual

Los combustibles fósiles son recursos limitados que proceden de los restos de organismos vivos transformados a lo largo de millones de años [261]. Actualmente se cubre el 82% de la demanda energética mundial a través de tres tipos de fuentes fósiles: petróleo, carbón y gas natural. (Figura 24).

La quema de los combustibles fósiles para satisfacer la alta demanda de energía, libera gases de efecto invernadero (GEI), que están causando calentamiento global y contribuyendo al cambio climático [262,263], así como otros gases contaminantes nocivos para el medio ambiente y la salud. Algunos de estos gases son el CO₂, CH₄, NO, NO₂, y el CO. Por ello, se requieren acciones más estrictas para controlar y limitar la emisión de CO₂ a la atmósfera que suele provenir del transporte y otros sectores que demandan mucha energía. En particular, la propagación del coronavirus (COVID-19) ha sentado un precedente en el consumo mundial de energía y en las emisiones GEI. Así, durante el periodo de cierre inicial, las restricciones aplicadas tanto a los transportes aéreos internacionales como a las industrias redujeron sustancialmente las emisiones de CO₂, tal y como han comprobado varios estudios [264,265]. Se observó una disminución global del 7,8% en las emisiones de CO₂ generadas por el uso de combustibles fósiles comparando el consumo durante el primer trimestre de 2020 con el primer trimestre de 2019 y, de igual forma, se estimó una disminución en la demanda energética del 6% en comparación con 2019 [266]. Sin embargo, la caída producida en emisiones de carbono de 2020 parece que fue solo temporal, ya que actualmente este consumo de energía primaria está cerca de alcanzar los niveles prepandemia (figura 24).

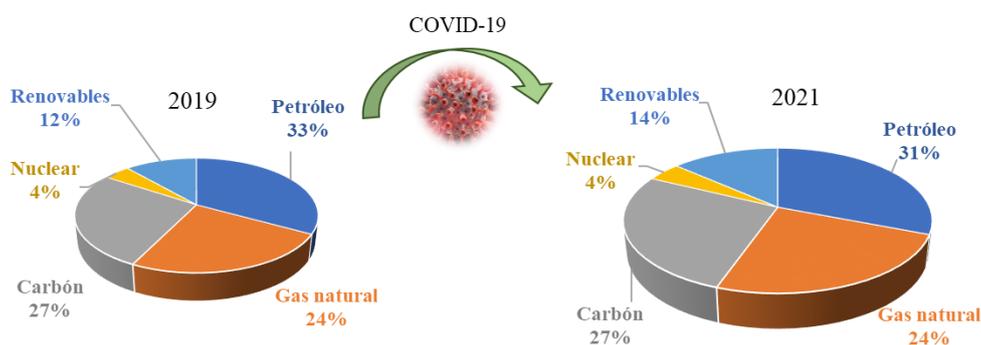


Figura 24. Comparativa del consumo de energía primaria mundial en 2019 y 2021 [267,268]

A pesar de ello, la situación de crisis creada por la pandemia ha dado lugar a una visión más amplia de los impactos observados, tanto en la economía mundial como en la demanda energética y las emisiones de CO₂ y puede ayudar a orientar y guiar a los legisladores y gobiernos hacia una mejor situación energética [269].

INTRODUCCIÓN

Aun así, debido al continuo aumento de la población y a la industrialización mundial, sobre todo en los países desarrollados, hay una creciente demanda de energía, que se prevé que aumente en un 35% en las próximas dos décadas [261]. Para satisfacer esa demanda de energía futura sin dañar el medioambiente, los combustibles fósiles han de ser reemplazados por energías renovables que, hasta la fecha, representan el 14% del consumo energético total. Los biocombustibles tienen el potencial necesario para reducir las emisiones de carbono y resolver algunos de los problemas de la alta demanda energética.

Por otra parte, se estima que las actividades humanas, desde el periodo preindustrial, han causado aproximadamente un aumento de 1°C en la temperatura global, desde 1900 [270,271]. Si se sigue actuando como hasta ahora es bastante probable que se alcancen los 1,5°C entre 2030 y 2052 [271]. Este incremento conllevará numerosas consecuencias ambientales como el aumento del nivel del mar, la degradación de los arrecifes de coral, sequías, etc.

Con el propósito de disminuir los efectos del cambio climático y aumentar la seguridad energética, aunque previamente hubo reuniones internacionales tanto en 1979 para tratar el problema del cambio climático como en 1988 para crear el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC), no fue hasta 1997 cuando las Naciones Unidas (ONU) desarrollaron el protocolo de Kioto (figura 25). Éste estableció una acción para reducir las emisiones de GEI en, al menos, un 5% (respecto a los niveles de 1990) entre 2008 y 2012 [272]. La Unión Europea se comprometió a reducir las emisiones en un 8% [273]. Con el mismo propósito, en 2015 se estableció el Acuerdo de París, mediante el cual, cada país determina, planifica y reporta su propia contribución para mitigar el calentamiento global, reduciendo sus emisiones de GEI, junto con la reconsideración de sus políticas energéticas, incluyendo el consumo de energía así como el cambio hacia una energía limpia y renovable [274].

INTRODUCCIÓN

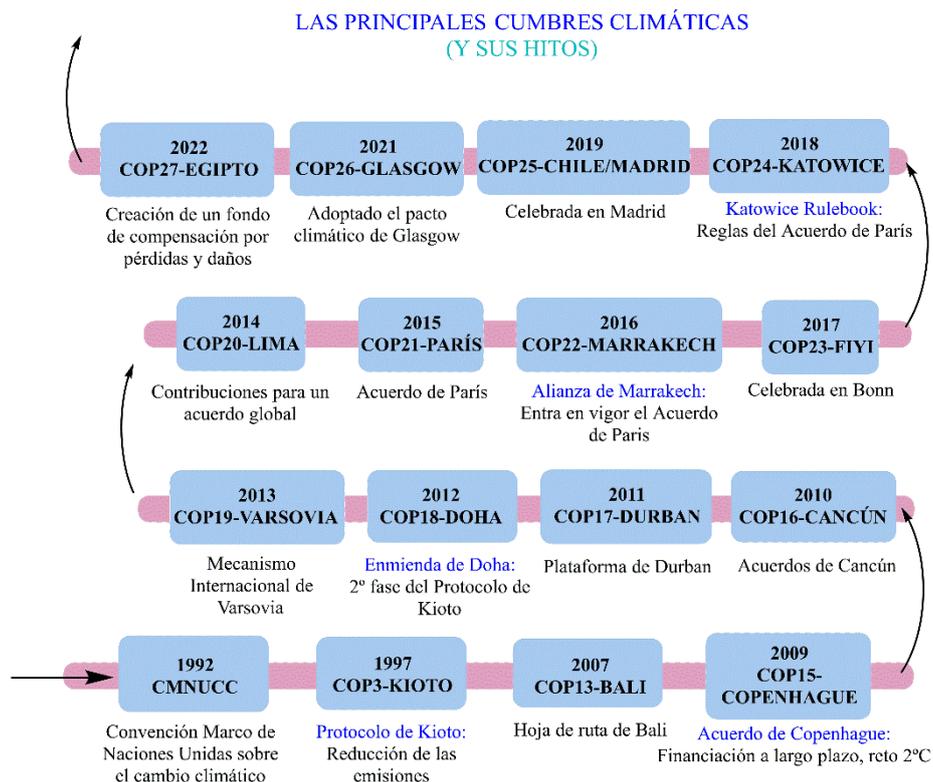


Figura 25. Las principales cumbres climáticas y sus hitos (Elaboración propia).

Tal y como se puede observar en la figura 25, desde el año 1992 se han alcanzado numerosos hitos en el proceso negociador en eventos como las COP (Conferencia de las Partes). A continuación, se resumen los acuerdos sobre el cambio climático más destacados:

- Establecimiento del objetivo para países desarrollados de aportar 100 mil millones de dólares para proyectos de financiación climática en países en vías de desarrollo.
- El segundo periodo de compromiso derivado del protocolo de Kioto que se extiende hasta 2020 a través de la conocida **Enmienda de Doha** (COP18).
- Aprobación del **Acuerdo de París**, un pacto con fuerza legal que contiene todos los elementos necesarios para construir una estrategia mundial de lucha contra el cambio climático para el periodo post 2020. En él se establece el compromiso de las Partes de mantener por debajo de los 2°C el aumento de la temperatura global desde los niveles preindustriales, y el esfuerzo por limitarlo a 1,5°C [275]. En este acuerdo, todavía en vigor, la UE presentó su estrategia de reducción de emisiones a largo plazo y sus planes climáticos actualizados antes de finales de 2020, y se comprometió a reducir las emisiones, como mínimo, en un 55% de aquí a 2030, con respecto a los niveles de 1990.

Una de las últimas conferencias de las Partes (COP26), celebrada en Glasgow en 2021, fue la 26ª reunión de las partes en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el cambio

INTRODUCCIÓN

climático y en ella, las partes examinaron los avances sobre sus compromisos en el marco del objetivo del **Acuerdo de París** de mantener el calentamiento global muy por debajo de 2°C con respecto a los niveles preindustriales y proseguir con los esfuerzos para limitarlo a 1,5°C. También se hizo hincapié en la urgencia y las oportunidades de avanzar hacia una economía neutra en carbono, de esta manera se dio origen al Pacto Climático de Glasgow. Por último, el lema de la última COP (COP27), celebrada en Sharm el Sheikh (Egipto), concretó que una de las prioridades de esta cumbre del 2022 es la necesidad de actuar. En este sentido, el mayor acuerdo ha sido la *creación de un fondo de compensación por pérdidas y daños*, conocido como Plan de Implementación de Sharm El Sheikh, para ayudar a los países en desarrollo que son particularmente vulnerables a los efectos adversos del cambio climático. Con respecto al objetivo de mantener por debajo de 1,5°C el aumento de la temperatura global a final de siglo, no ha sido posible encontrar un consenso. Así que, los países participantes se comprometieron a revisar y fortalecer sus contribuciones nacionales para favorecer una mayor reducción de emisiones.

Las energías renovables como la solar, eólica, hidráulica, geotérmica y la procedente de la biomasa han sido reconocidas por la sociedad como fuentes de energía alternativa a los combustibles fósiles. Estos últimos años, se han desarrollado numerosas políticas que promueven las energías renovables. Para el 2010, la UE propuso el objetivo, a partir de la Directiva 2001/77/CE, de fomentar un aumento de la contribución de las fuentes de energía renovables a un 12% y, en particular, con una parte indicativa del 22,1% de electricidad generada a partir de fuentes de energía renovables [276]. Hasta hace muy poco, concretamente hasta 2020, la normativa de referencia venía encabezada por la Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, partía del mismo supuesto que la anterior, el control del consumo de energía en Europa y la mayor utilización de energía procedente de fuentes renovables. Establecía que el consumo de energías renovables en la UE debía ser del 20%. Además, en los combustibles destinados al transporte, debían representar un 10% [277].

En 2018, la Unión Europea actualizó por completo su política energética con dos nuevas directivas sobre energía procedente de fuentes renovables y eficiencia energética (Directivas 2018/2001 y 2018/2002, respectivamente). La Directiva 2018/2001, la más reciente y que deroga la Directiva de 2009, fija objetivos más ambiciosos sobre la contribución de las energías renovables, tanto en el consumo bruto de energía como en el consumo de energía final para el transporte en 2030. El nuevo objetivo es que al menos, en 2030, un 32% del consumo final de energía proceda de fuentes renovables [278]. La Comisión evaluará este objetivo, con vistas a presentar una propuesta legislativa a más tardar en 2023.

Por otra parte, Europa se ha propuesto como objetivo de aquí a 2050 ser el primer continente climáticamente neutro. Por ello, la Comisión Europea presentó el 11 de diciembre de

2019 el Pacto Verde Europeo [279]. Con este Pacto se pretende buscar una UE equitativa y próspera, competitiva y eficiente en el uso de recursos (concepto de economía circular) y que, además, no tenga emisiones netas de GEI para 2050 [280]. De forma paralela, en mayo de 2021 en España, se aprobó un proyecto de Ley de cambio climático y transición energética, con la que se pretende alcanzar la descarbonización de España en 2050. Esta ley tiene como objetivos mínimos nacionales para el año 2030 [281]:

- Reducir las emisiones GEI, al menos, un 23% respecto del año 1990.
- Alcanzar una inclusión de energías de origen renovable en el consumo final de, al menos, un 42%.
- Alcanzar un sistema eléctrico con, al menos, un 74% de generación a partir de energías de origen renovables.

1.3.2. Biocombustibles

La energía de biomasa, o bioenergía, es actualmente la cuarta fuente de energía primaria más importante del mundo. La biomasa es el sustituto potencial de los combustibles fósiles. Cuando los organismos fotosintéticos, como las plantas superiores y las microalgas crecen, el carbono necesario para ese crecimiento proviene del CO₂ presente en la atmósfera, siendo liberado de nuevo al medioambiente tras su combustión. Por ese motivo, la biomasa se considera un combustible neutro en carbono [282].

Debido a las numerosas ventajas de los biocombustibles, los gobiernos han establecido un incremento de su producción, para que sean capaces de cubrir el 27% de la demanda total para el transporte en 2050 [283]. La cuota de energía procedente de fuentes renovables utilizada para el transporte en la UE aumentó desde menos del 2% en 2015 al 10,2% en 2020. Para el uso de los biocombustibles éstos han de ser viables, es decir, ser económicamente competitivos con los combustibles fósiles, no requerir grandes superficies de tierra, mejorar la calidad del aire (por ejemplo, captura de CO₂), y deben demandar un uso mínimo de agua [284]. Por estos motivos, el uso de microalgas con fines energéticos podría cumplir estas condiciones y, por lo tanto, contribuir de manera significativa a la demanda de energía primaria, y, de igual forma, proporcionar beneficios ambientales. Dependiendo de la materia prima de partida, los biocombustibles se pueden clasificar en combustibles de primera, segunda, tercera y cuarta generación (figura 26) [285].

INTRODUCCIÓN

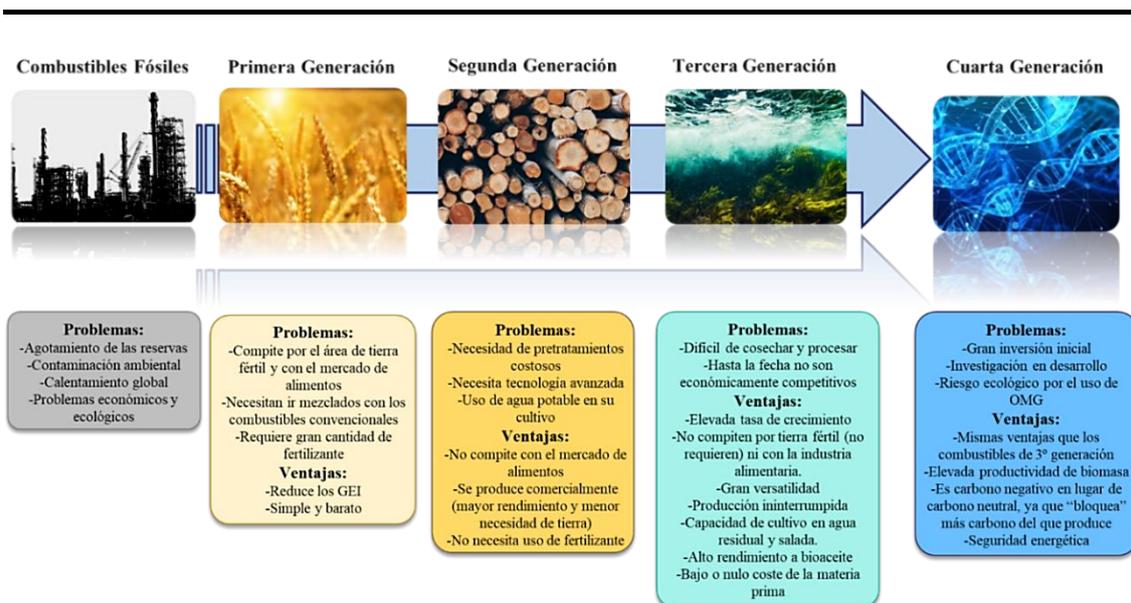


Figura 26. Clasificación de los combustibles. Elaboración propia.

Los biocombustibles de primera generación (1G) son aquellos producidos por tecnología convencional (sin demasiada complejidad tecnológica) a partir de cultivos alimenticios como el maíz, la caña de azúcar, remolacha, y aceites vegetales. Pueden ofrecer algunos beneficios como su neutralidad en CO₂, debido a que las emisiones de CO₂ en su ciclo productivo pueden ser neutralizadas por el CO₂ absorbido durante el crecimiento de los cultivos energéticos mediante la fotosíntesis. Es justamente el uso de cultivos que compiten con los alimenticios lo que supone el punto débil de los combustibles 1G, puesto que, para producirlos, utilizan suelos agrícolas, fertilizantes y agua; recursos que deberían ser utilizados para la producción de alimentos para el consumo humano. Por ese motivo, cabría destacar que una acelerada producción de biocombustibles 1G en un futuro puede causar encarecimiento de los alimentos o provocar su escasez [286]. Estos biocombustibles (biodiésel, bioetanol y biogás) necesitan ir mezclados con combustibles derivados del petróleo, lo que supone una clara desventaja.

Los biocombustibles de segunda generación (2G) se producen principalmente a partir de cultivos no alimentarios ricos en biomasa lignocelulósica tales como pasto o madera; o ricos en materia oleaginosa tales como aceites no comestibles; así como materias residuales tales como paja de cereal, bagazo de caña de azúcar, residuos forestales, o aceites vegetales usados. Estos biocombustibles se desarrollaron por las limitaciones que presentan los biocombustibles 1G, sin embargo, algunos requieren una gran superficie arable de tierra para su cultivo. Otros necesitan pretratamientos química y energéticamente muy costosos para romper su estructura, lo que conlleva una elevada inversión inicial [287].

Los biocombustibles de tercera generación (3G) o biocombustibles avanzados son aquellos generados a partir de microalgas, algas o microorganismos. Se presentan como una

prometedora fuente de energía alternativa a los combustibles de primera y segunda generación. Las microalgas tienen numerosas ventajas ya que solo necesitan CO₂, nutrientes, agua y luz para crecer. También se ha demostrado que muchas de ellas crecen en aguas residuales y salinas, lo cual reduce la problemática de la necesidad de un medio de agua dulce, reduciendo así los costes y su impacto ambiental. Para el caso de estos biocombustibles, su rendimiento energético es muy favorable en comparación con los combustibles tradicionales, ya que el balance energético es positivo (la energía que producen es mayor a la energía consumida durante su producción), manteniendo de esa forma una huella de carbono mucho menor [288].

Las microalgas tienen un elevado potencial en la producción de biocombustibles debido a su elevada productividad lipídica y de biomasa, no compiten por tierras fértiles (son cultivables en suelos pobres) por lo que no compiten con el mercado alimentario, y también son cultivables en aguas saladas, etc. Además, poseen una alta tolerancia a condiciones de estrés ambientales [263] y, en muchos casos, este estrés genera gran variedad de bioproductos de interés industrial.

La elevada tasa de crecimiento de las microalgas hace posible considerarlas eficaces para satisfacer la alta demanda de biocombustibles sin ocupar tanta superficie de tierra como los combustibles de primera y segunda generación [289]. Por otro lado, una de las principales desventajas del uso de las microalgas para la producción de biocombustibles es la baja concentración de biomasa que se obtiene en la etapa de cultivo. Esto es debido al límite de penetración de la luz y, combinado con el pequeño tamaño de las células de las microalgas, hace que la etapa de cosechado de biomasa sea relativamente costosa [289]. De igual forma, el gran contenido de agua en la biomasa de microalgas recolectada también implica que la etapa de secado sea un proceso que consume mucha energía. Sin embargo, con el desarrollo tecnológico de estos últimos años, existen procesos termoquímicos que no necesitan el secado de la biomasa microalgal, como es la licuefacción hidrotérmica; de igual forma, se pueden extraer lípidos para producir biodiésel sin necesidad de secar previamente la biomasa [290].

Los biocombustibles de cuarta generación (4G) normalmente utilizan microorganismos modificados para lograr una mayor producción de biocombustibles. Las estrategias más comunes para la modificación genética de microalgas se basan en la mejora de la eficiencia fotosintética, aumentando la penetración de la luz y la reducción de la fotoinhibición [291].

1.3.2.1. Biocombustibles a partir de microalgas

El estudio de las microalgas como fuente de combustibles alternativos comenzó en la década de 1970 como consecuencia de la primera crisis del petróleo. Pero los altos costes de producción y las limitaciones vinculadas a estos procesos impidieron su desarrollo comercial [289].

INTRODUCCIÓN

Sin embargo, actualmente, la utilización de las microalgas para la producción de biocombustibles ofrece las siguientes ventajas con respecto a plantas superiores [292]:

- (1) Las microalgas sintetizan y acumulan grandes cantidades de lípidos neutros (20-50% del peso seco de biomasa).
- (2) Presentan elevadas tasas de crecimiento y son capaces de producir durante todo el año.
- (3) Necesitan menos agua que los cultivos terrestres, por lo que reducen la carga de fuentes de agua dulce.
- (4) El cultivo de microalgas no requiere de la aplicación de herbicidas o pesticidas.
- (5) Las microalgas captan el CO₂ de los gases de combustión emitidos por las centrales eléctricas alimentadas con combustibles fósiles, reduciendo así las emisiones GEI.
- (6) Participan en la biorremediación de aguas residuales.
- (7) Tienen capacidad para crecer en varios tipos de agua (salina, salobre, agua de mar, aguas residuales) y en condiciones de estrés.
- (8) Son cultivables en tierras no fértiles, por lo que no compiten por los recursos de la agricultura convencional.

Se pueden producir diferentes tipos de biocombustibles a partir de las microalgas como, por ejemplo, fermentativos (bioetanol y biobutanol), sólidos (*biochar*), líquidos (biodiésel) y gaseosos (hidrógeno y metano) [263]. En la composición química de las microalgas están presentes lípidos que son químicamente análogos a los lípidos derivados de aceites vegetales. Esto hace que las microalgas sean una fuente potencialmente interesante para la producción de biodiésel [293]. Sin embargo, se ha observado que la producción de biodiésel de las microalgas tiene ciertas limitaciones tanto en términos de calidad como en que solo se aprovecha su fracción lipídica; por ello, puede ser un proceso que no sea económicamente viable. Gracias al estudio del biodiésel a partir de microalgas y debido a sus limitaciones surgieron en los últimos años varias tecnologías de conversión para obtener distintos tipos de biocombustibles mediante procesos bioquímicos, químicos y termoquímicos (figura 27), que intentan aprovechar, de forma integral, toda la biomasa microalgal:

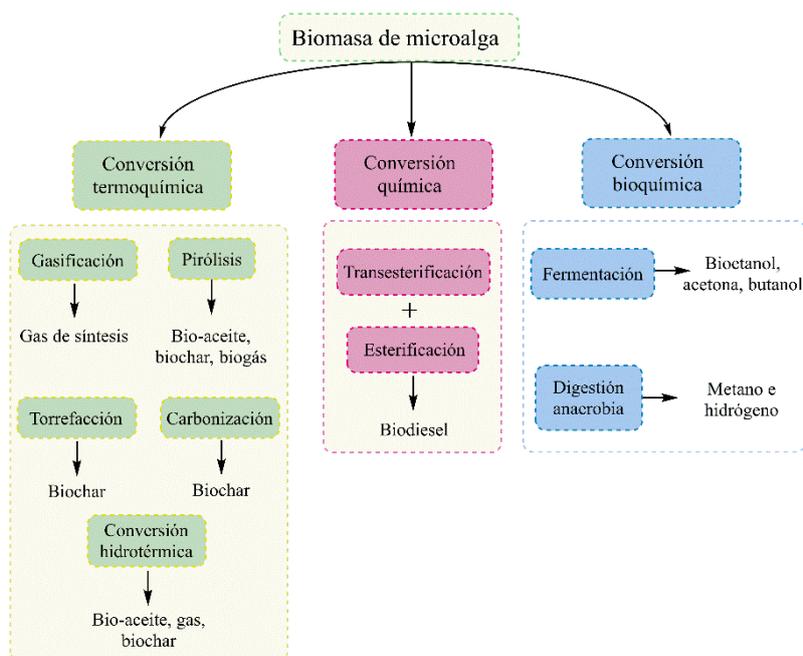


Figura 27. Rutas para la producción de biocombustibles a partir de biomasa de microalga (modificado de [285,292]).

❖ Conversión termoquímica

La conversión termoquímica es el proceso mediante el cual se descompone el contenido orgánico de la biomasa de microalgas para producir biocombustibles. Según la temperatura, la presión y el tiempo de operación, la conversión termoquímica se puede clasificar, a su vez, como gasificación, pirólisis, torrefacción, carbonización y conversión hidrotérmica [285]. En el proceso termoquímico, los compuestos orgánicos de la biomasa se descomponen a temperaturas y/o presiones elevadas. Este proceso proporciona una ruta más sencilla para generar biocombustibles, en comparación con los procesos químicos y bioquímicos [294]. De igual forma, la conversión termoquímica, es rápida, no necesita la adición de productos químicos y puede convertir una gran variedad de materias primas de biomasa en biocombustibles. Por todo lo mencionado, la conversión termoquímica es uno de los métodos cruciales para producir biocombustibles a partir de microalgas [282]. En la figura 28 se muestran los intervalos de temperatura habituales para las distintas técnicas de conversión termoquímica.

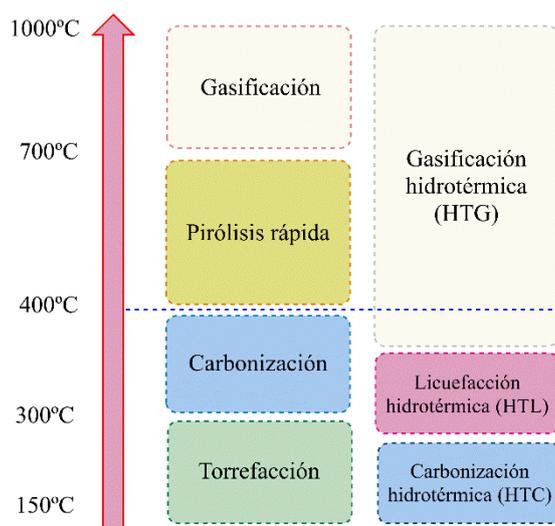


Figura 28. Temperaturas típicas de los distintos procesos de conversión termoquímica (modificado de [295]).

Gasificación

La gasificación es un proceso mediante el cual los materiales carbonosos se convierten termoquímicamente en una mezcla de gases valiosos, comúnmente denominada gas de síntesis (H_2 , CO , CH_4) [294,296]. Este proceso se lleva a cabo en presencia de un agente gasificante como el aire, oxígeno, vapor de agua, CO_2 o una combinación de ellos a una temperatura superior a $700^\circ C$ ($800-1000^\circ C$) y en un rango de presiones de 1-10 bar [282].

La materia prima que puede ser empleada en procesos de gasificación es muy diversa, desde residuos del tipo lignocelulósico, como los residuos agrícolas o los forestales, siempre y cuando no tengan un contenido en humedad elevado. A pesar de que las microalgas no se encuentran entre el tipo estándar de biomasa utilizada en gasificación, existen estudios que evalúan la posibilidad de implementar la gasificación para convertirlas en un combustible muy valioso [297].

Generalmente este proceso ocurre en cuatro etapas: (1) secado ($100-200^\circ C$), para eliminar la humedad residual, (2) pirólisis ($200-700^\circ C$), mediante la cual se rompe la estructura sólida de la biomasa en moléculas menos complejas, (3) oxidación ($700-1500^\circ C$), para quemar parte de la biomasa entrante y proporcionar el calor para sostener los procesos endotérmicos y (4) gasificación ($800-1000^\circ C$), para convertir los productos de pirólisis en moléculas más pequeñas con un alto valor energético [262,297]. En la figura 29 se puede ver un esquema del proceso de gasificación.

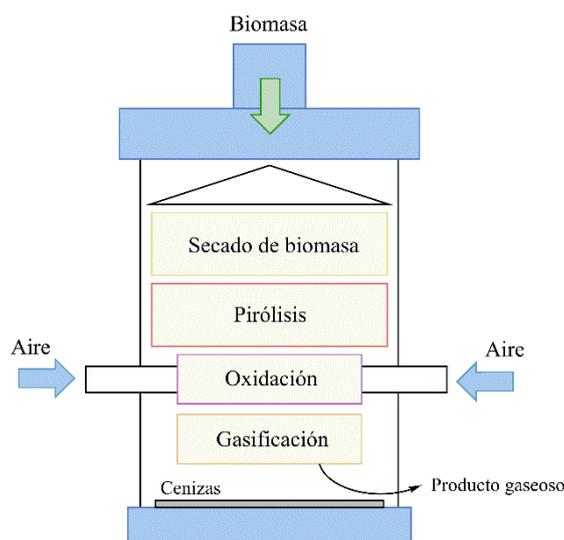


Figura 29. Esquema del proceso de gasificación (modificado de [298]).

Pirólisis

La pirólisis es un tratamiento térmico que se lleva a cabo en ausencia de oxígeno, a una temperatura de 400-600°C y a presión atmosférica para el caso de pirólisis de microalgas [263,294]. La temperatura de reacción depende de algunos factores como pueden ser la presencia o no de catalizador y si la pirólisis es asistida o no por microondas. De tal forma que, la temperatura puede variar desde 800°C cuando se realiza la pirólisis por microondas a 300°C cuando se lleva a cabo en presencia de catalizador [282]. La pirólisis es uno de los procesos termoquímicos más utilizados para degradar la biomasa carbonosa, como la celulosa, la hemicelulosa y la lignina [296]. Las microalgas también son materias primas viables para la pirólisis porque los bioaceites producidos a partir de ellas son más estables que los de la biomasa lignocelulósica [299].

El proceso consiste en transformar la biomasa seca (concretamente los constituyentes orgánicos) en tres tipos de productos: gas, *biochar* y una fase líquida conocida como bioaceite o biocrudo. La pirólisis tiene como objetivo producir biocombustibles de un poder calorífico medio-bajo [263]. Dependiendo de las condiciones de funcionamiento (temperatura, velocidad de calentamiento y duración), se pueden clasificar en cuatro modos de pirólisis: pirólisis lenta, pirólisis rápida, pirólisis catalítica y pirólisis por microondas.

La pirólisis lenta se caracteriza por una velocidad de calentamiento baja (5-10°C/min) y un tiempo de residencia prolongado del vapor caliente, mientras que la pirólisis rápida se caracteriza por una velocidad de calentamiento alta (10-600°C/s) y un tiempo de residencia corto para conseguir una mayor velocidad de reacción y un mayor rendimiento de bioaceite [282]. Cuando el objetivo es la producción mayoritaria de productos líquidos y gases, se emplea el proceso de pirólisis rápida, y, por ese motivo, ha recibido una mayor atención para la producción

INTRODUCCIÓN

de bioaceite. Miao y col. [300] señalaron que los bioaceites que proceden de una pirólisis rápida de microalgas tienen poderes caloríficos más elevados y un menor contenido en oxígeno en comparación con los bioaceites que se obtienen de la madera. Sin embargo, cuando el objetivo es la obtención mayoritaria de productos sólidos y tener una baja proporción de productos líquidos, se emplea el proceso de pirólisis lenta. La pirólisis lenta se ha utilizado durante miles de años para la conversión de madera en *biochar*. En la figura 30 se presenta el esquema del proceso que normalmente se utiliza para la pirólisis lenta.

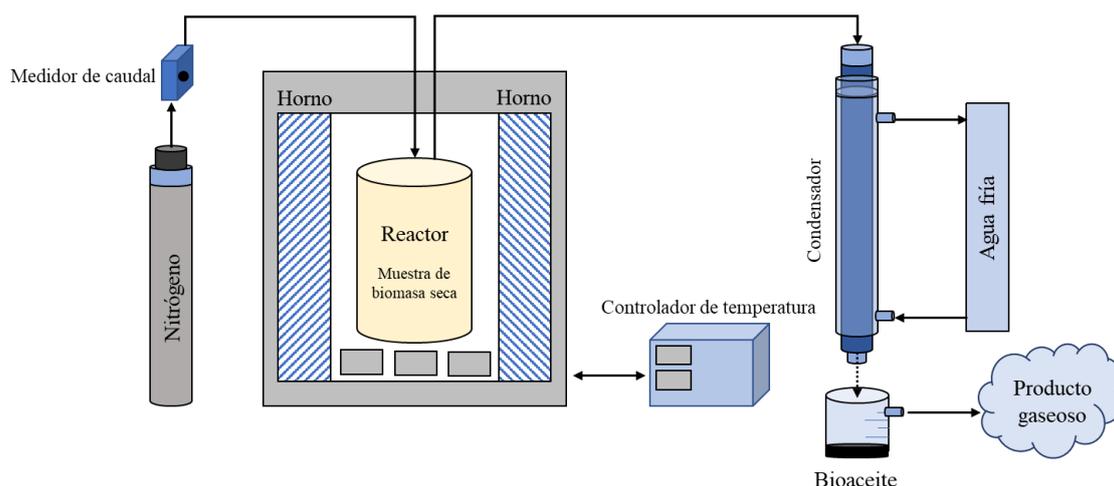


Figura 30. Esquema del proceso de pirólisis (modificado de [301]).

El sistema incluye un horno eléctrico, un controlador de flujo, un controlador de temperatura, un condensador y un baño térmico (agua fría). El gas portador, que normalmente es nitrógeno, se suministra al reactor desde la parte superior. Se utiliza un medidor de flujo para controlar la tasa de entrada del gas portador. La biomasa seca se calienta dentro del reactor utilizando el horno eléctrico y los productos generados son arrastrados por el gas portador. A la salida del reactor se coloca el condensador para recoger los productos en forma líquida [294].

La pirólisis de microalgas lleva asociado el desafío que supone la eliminación del exceso de agua que trae consigo. La suspensión de microalgas después del proceso de deshidratación tiene un 24% de biomasa y debe deshidratarse aún más, hasta un 80% antes del proceso de pirólisis [302], incrementando el coste y el consumo energético del proceso global.

Torrefacción

En este proceso, la biomasa se degrada térmicamente en atmósfera inerte, en un rango de temperaturas que oscilan entre 200-300°C. El tiempo de reacción puede ser muy variable, desde varios minutos hasta varias horas. Se ha observado que el rendimiento de sólido disminuye con el aumento del tiempo de reacción y de la temperatura [303].

INTRODUCCIÓN

La torrefacción no solo puede eliminar la humedad de la biomasa sino que también puede causar la degradación térmica de celulosa, hemicelulosa y lignina en biomasa lignocelulósica así como la de carbohidratos, proteínas y lípidos en biomasa de microalgas [303]. Este proceso se asemeja a la pirólisis, solo que en vez de operar a temperaturas de entre 400-600°C presenta temperaturas de operación más suaves, por eso a la torrefacción también se la ha denominado pirólisis suave [282].

Su objetivo es la obtención de *biochar* como producto principal. Se han desarrollado varios métodos de torrefacción como la torrefacción convencional, de microondas, húmeda y oxidativa. La convencional es el método más utilizado para la producción de biocombustibles sólidos a partir de microalgas.

La presencia de un alto contenido en agua aumenta los costes operativos para deshidratar o secar la biomasa antes de la pirólisis, la gasificación y la combustión [304]. Para el caso de la torrefacción esto no supone ningún problema, lo que resulta muy ventajoso.

Carbonización

La carbonización es una de las técnicas termoquímicas más antiguas para aumentar el contenido energético de la biomasa. Durante siglos ha sido adoptada para producir carbón vegetal a partir de la biomasa vegetal. En comparación con la torrefacción, la carbonización tradicional es una conversión a largo plazo que requiere una tasa de calentamiento baja, pero normalmente necesita una temperatura más alta (>300°C), lo que conlleva reacciones más complejas durante el proceso [295]. La carbonización se puede considerar como una torrefacción adicional, a temperaturas más altas, de hasta 500°C.

La torrefacción y la carbonización se consideran procesos similares en muchos aspectos, pero la diferencia principal entre ambas radica en la motivación de su producción ya que la torrefacción tiene como objetivo maximizar la energía total y los rendimientos máxicos de la biomasa sin una descomposición severa de su estructura, mientras que la carbonización tiene como objetivo maximizar el contenido de carbono fijo y minimizar el de hidrocarburos en la biomasa tratada. Otra diferencia se refiere a los compuestos volátiles de la biomasa, ya que la carbonización elimina la mayoría de ellos, mientras que la torrefacción retiene la mayor parte [305]. Ambos son procesos de pretratamiento de la biomasa a temperaturas suaves, por lo que el uso de un catalizador en el proceso no resulta esencial.

Hay otro tipo de carbonización llamada carbonización hidrotérmica (HTC), también conocida como “carbonización acuosa”. A diferencia de la producción de carbón mediante carbonización tradicional, la HTC necesita agua como disolvente y es por este motivo por el que se desarrollará más detalladamente dentro del apartado de *conversión hidrotérmica*.

Conversión hidrotérmica

Las reacciones hidrotérmicas han sucedido en la naturaleza, siendo responsables de la conversión de restos de plantas, animales y microorganismos en diferentes formas de combustibles fósiles como el carbón y el petróleo. Por este motivo, el ser humano decidió copiar estas reacciones geológicas para la producción de biocombustibles mediante la transformación de biomasa húmeda [306].

Uno de los mayores desafíos para la obtención de biocombustibles a partir de microalgas, son los costes a gran escala asociados a ellas como pueden ser el cultivo, el cosechado y el secado de las mismas [307]. Con respecto a la última, este tipo de conversión resulta muy ventajosa, puesto que utiliza biomasa húmeda directamente y no requiere la adición de disolventes orgánicos y, por consiguiente, consigue una alta eficiencia de extracción y de producción. Al no requerir de la etapa de secado, lo cual implica casi el 50% de la energía requerida, los costes energéticos asociados disminuyen notablemente y esto conduce a que esta técnica sea económicamente viable e implementable en la industria [308]. La conversión hidrotérmica es un término colectivo para describir 3 posibles rutas de transformación: (i) carbonización hidrotérmica (HTC), (ii) gasificación hidrotérmica (HTG) y (iii) licuefacción hidrotérmica (HTL).

Carbonización hidrotérmica

Es un proceso de conversión termoquímica suave para convertir la biomasa en materiales ricos en carbono empleando temperaturas de 130°C-280°C [309] y presiones de 2-10 MPa [310]. Durante el proceso de HTC, la biomasa sufre varias reacciones de hidrólisis, produciendo una amplia gama de productos, seguidas de reacciones descarboxilación y deshidratación del producto hidrolizado [310]. Los productos principales son carbones activos y *biochar*. Se ha demostrado que la biomasa de microalgas se puede convertir fácilmente en *biochar* con cualidades similares a las del carbón bituminoso a temperaturas de, aproximadamente, 200°C y presiones de 2 MPa, en menos de una hora [311].

El proceso de HTC normalmente se lleva a cabo en un tiempo comprendido entre 1 y 12 horas y el *biochar* producido contiene el 50-70% de la biomasa total y alrededor del 75% de la energía total de la biomasa de partida [312].

Aparte de evitar la etapa de secado, ya que en este proceso se necesita agua como disolvente, lo que es una enorme ventaja y conduce a un menor gasto energético, también se obtienen mayores rendimientos del producto en menos tiempo.

Gasificación hidrotérmica

La gasificación hidrotérmica es la más severa desde el punto de vista térmico. Las condiciones típicas de este proceso son temperaturas de 400-700°C y presiones de 25-30 MPa [313]. Concretamente, se puede llevar a cabo sin catalizador a 400-800°C y en presencia de catalizadores a 350-400°C [314]. Los productos gaseosos que se obtienen con este proceso incluyen hidrógeno, metano y dióxido de carbono, pero además, también se pueden recuperar la mayoría de los nutrientes, agua y dióxido de carbono que puede ser reinyectado en el sistema de cultivo de microalgas [315]. Por ello, este proceso también se ha extendido para transformar la biomasa de estos microorganismos.

Licuefacción hidrotérmica

La licuefacción hidrotérmica (HTL) es una forma de procesamiento hidrotermal que involucra la conversión de una amplia gama de biomasa en un medio de agua comprimida y caliente en condiciones subcríticas con o sin catalizadores, para producir un producto principal llamado bioaceite o biocrudo [310]. Durante el proceso de HTL tienen lugar reacciones químicas muy complejas que transforman la biomasa en biocrudo. Esta complejidad de las reacciones es debida a la naturaleza de la biomasa. La licuefacción hidrotérmica ocurre en una escala de tiempo entre minutos y horas [316] y las condiciones de temperatura, presión y tiempo de reacción suelen estar en torno a los 300-370°C, 5-25MPa y 5-60 minutos, respectivamente [313]. Las altas presiones utilizadas en este proceso son necesarias para mantener el disolvente que acompaña a la microalga en estado líquido. Estas condiciones se establecen con el fin de descomponer la biomasa e hidrolizar las macromoléculas en compuestos orgánicos de menor peso molecular [297,317].

Los productos que se obtienen, aparte del biocrudo o bioaceite, son una fase gaseosa, una fase acuosa y una fase sólida. El biocrudo producido, tiene un valor energético cercano al del petróleo y, aunque no es adecuado para utilizarse directamente como combustible para el transporte, se espera que sea una materia prima renovable adecuada para el coprocesado en las refinerías de petróleo existentes [313].

En los últimos años, el número de trabajos asociados a este proceso, junto con la aplicación de éste a las microalgas, ha aumentado significativamente, lo que implica un aumento del interés por esta tecnología de conversión. Este proceso será uno de los estudiados en la presente tesis doctoral, por lo que se desarrollará más detalladamente en el *apartado 1.3.3*.

❖ **Conversión química**

El biodiésel se obtiene a partir de la conversión química. Éste está constituido por ésteres de ácidos grasos que se pueden obtener a partir de los lípidos saponificables (triglicéridos, principalmente) y los ácidos grasos contenidos en las microalgas mediante reacciones de transesterificación y esterificación, respectivamente [318]. Los alcoholes que se pueden utilizar en las reacciones de transesterificación, que es el método más usado, son metanol, etanol, propanol y butanol. Sin embargo, el metanol es el que se ha utilizado más extensamente debido a su bajo coste y disponibilidad, dando lugar a los ésteres metílicos correspondientes.

En el caso de que los lípidos saponificables sean triglicéridos, se obtienen ésteres metílicos y glicerina en la transesterificación. La reacción global se representa en la figura 31 para el caso en el que el alcohol empleado sea metanol.

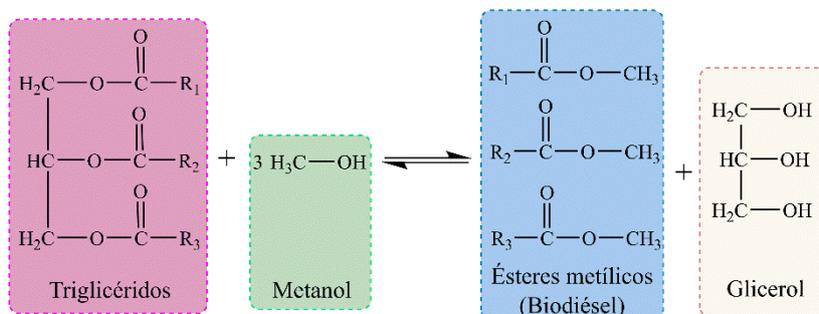


Figura 31. Esquema de la reacción de transesterificación de los triglicéridos con metanol (modificado de [319,320]).

En la figura anterior se representa la reacción global de transesterificación, pero realmente, esta reacción se lleva a cabo mediante tres reacciones reversibles consecutivas. Los triglicéridos son convertidos en diglicéridos, a continuación, en monoglicéridos y, por último, en los productos finales glicerol y ésteres metílicos (figura 32).

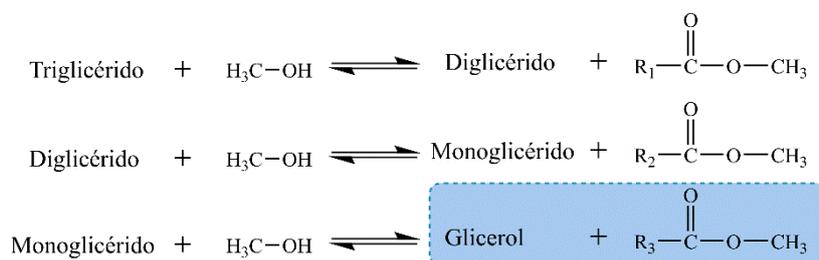


Figura 32. Etapas de la reacción de transesterificación de los triglicéridos con metanol (modificado de [320]).

Durante la esterificación, los ácidos grasos se convierten en presencia de un alcohol en biodiésel, tal y como se muestra en la figura 33.

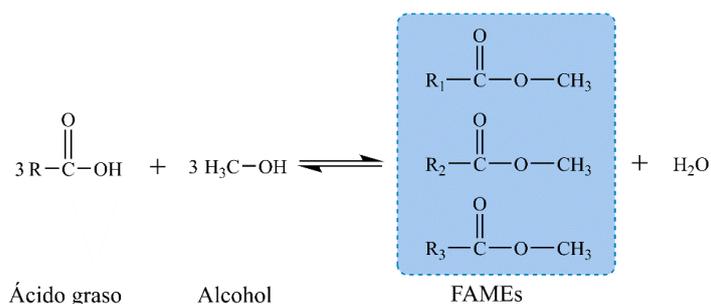


Figura 33. Reacción general de esterificación de ácidos grasos (modificado de [320]).

Tanto la transesterificación de triglicéridos como la esterificación de ácidos grasos libres son los métodos más comunes de convertir la biomasa de microalgas en biodiésel. De forma general, se extraen los lípidos y, a continuación, se producen las reacciones de transesterificación y esterificación (proceso indirecto). Otra opción, el proceso directo, consiste en combinar la extracción de lípidos con la etapa de reacción, utilizando el alcohol como disolvente de extracción y como reactivo en una misma etapa. Esto hace que el proceso sea más sencillo y económico [318].

❖ Conversión bioquímica

La conversión bioquímica se puede clasificar en dos tipos: fermentación y digestión anaeróbica. Este tipo de conversión se puede desarrollar con biomasa húmeda de microalgas.

Fermentación

La fermentación es un proceso metabólico que convierte sustratos orgánicos como la sacarosa, el bagazo, la celulosa o el almidón en etanol, a través de actividades microbianas [263]. Las microalgas con una concentración de carbohidratos relativamente alta son las más adecuadas como materia prima para producir bioetanol. Sin embargo, la mayoría de las especies de microalgas tienen una composición en carbohidratos muy baja, pero tienen la ventaja de que, en la etapa de cultivo, se puede controlar y adaptar la composición de dicha biomasa, controlando el nivel de nutrientes y la fuente de luz, entre otros.

El proceso de hidrólisis para la producción de bioetanol implica la descomposición de azúcares complejos (carbohidratos) como, celulosa, manitol, alginato y agar presentes en microalgas marinas en azúcares fermentables simples, como glucosa, galactosa, manosa, xilosa y arabinosa, aptos para la producción de etanol [321,322]. El rendimiento de bioetanol producido por las microalgas es de dos a cinco veces mayor que el etanol producido a partir de caña de azúcar y maíz [323,324]. Antes de la fermentación, se libera el almidón de las células de las microalgas mediante pretratamientos mecánicos, enzimáticos o químicos. A continuación, se agrega la levadura que convierte el azúcar en etanol, y, por último, se purifica el etanol por destilación [325].

Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es el proceso bioquímico mediante el cual, diferentes tipos de microorganismos descomponen la materia orgánica compleja en ausencia de oxígeno, generando diversos gases. Entre los gases generados el dióxido de carbono y el metano son los más abundantes, pero también se generan otros gases no deseados como el NH₃ y H₂S [326]. El proceso es común en ambientes naturales como sedimentos marinos, estómago de rumiantes o en turberas, donde la disponibilidad de oxígeno es limitada o nula.

Es un proceso que consta de varias etapas enlazadas, en el que el material inicial es continuamente degradado en unidades más pequeñas, y, en cada una de ellas intervienen grupos específicos de microorganismos. Estas etapas consecutivas son la hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis [327]. Como se trata de uno de los procesos estudiados en la presente tesis doctoral, se ha desarrollado con más detalle en el *apartado 1.3.4*.

1.3.3. Licuefacción hidrotérmica de microalgas

Tradicionalmente, la conversión de microalgas en biocombustibles se ha llevado a cabo mediante métodos bioquímicos, como la fermentación; métodos termoquímicos, como la pirólisis rápida y métodos químicos, como la transesterificación. Sin embargo, dentro de los métodos termoquímicos, la licuefacción hidrotérmica de microalgas es una técnica que ha resultado ser muy prometedora ya que permite la conversión de biomasa húmeda, evitando así la etapa de secado y reduciendo así los costes asociados a ella. Por otro lado, resulta muy atractiva ya que los bioaceites producidos consiguen alcanzar altos poderes caloríficos, próximos a los del crudo de petróleo (43 MJ/kg) [313,328] y las fracciones de producto obtenidas: bioaceite, fase acuosa, fase sólida y fase gaseosa presentan diversas aplicaciones.

La mayor parte de la biomasa existente se puede procesar mediante HTL debido a su naturaleza hidrófila, pero las biomasas más utilizadas en el proceso de HTL son las biomasas del tipo lignocelulósicas, procedente de macroalgas, de estiércol de cerdo, de residuos orgánicos y de microalgas (tabla 6) [329,330].

INTRODUCCIÓN

Tabla 6. Resumen de materias primas y propiedades de los bioaceites generados a partir de HTL.

Biomasa	Propiedades del bioaceite			
	Rendimiento (% p/p)	HHV (MJ/kg)	N (%)	O (%)
Lignocelulósica [331]	15-28	35,5-40	< 1,6	14-17
Macroalga [332]	8-32	27,1-36,5	4-7	12-13
Microalga [313,333]	32,6-61	26-39	3,9-7	5-18
Estiércol de cerdo [334]	30,2	34,7	3,7	15,6
Residuos orgánicos [330]	23	34,2	6	11

De entre todas las biomásas, la procedente de las microalgas es la que resulta más prometedora ya que, principalmente, se alcanzan rendimientos a bioaceite mucho más elevados, con respecto a otras biomásas. Estos bioaceites también poseen un poder calorífico próximo al del petróleo crudo (42-43 MJ/kg) [331]. Barreiro y colaboradores [313] recogieron en su estudio las propiedades de numerosos bioaceites obtenidos a partir de licuefacción hidrotérmica procedentes de una gran variedad de microalgas. El rendimiento a bioaceite varía mucho en función de las condiciones de reacción y del tipo de microalga. Como se ha señalado en la tabla 6 se han llegado a alcanzar rendimientos de hasta el 61% p/p, en base seca (bs). Sin embargo, aunque el poder calorífico es elevado, como se ha mencionado anteriormente, puede variar según la especie. De forma general, el contenido de N y O en el bioaceite suele ser elevado y variable (3,9-7 y 5-18% p/p bs, respectivamente).

Parsa y colaboradores [332] recogieron en su estudio un resumen de procesos de HTL de macroalgas verdes y marrones. En este estudio concluyen que el rendimiento a bioaceite depende, al igual que en el caso de las microalgas, de las condiciones de reacción y de la especie (8-32% p/p bs). En general, tanto el rendimiento como el HHV, que no supera los 36,5 MJ/kg, están por debajo de los correspondientes valores obtenidos mediante el uso de microalgas. A pesar de las ventajas de los compuestos lignocelulósicos como su bajo coste y que presentan HHV y contenidos de N adecuados, su rendimiento es bastante bajo si no se emplea un catalizador o un codisolvente (15-28% p/p, bs) [331]. Esto mismo ocurre con los residuos orgánicos y el estiércol ya que presentan rendimientos a bioaceite mucho más bajos que en el caso de las microalgas (32,6-61% p/p bs).

1.3.3.1. Productos obtenidos

En el proceso de HTL se obtienen cuatro fases diferentes que se pueden aprovechar para diversos fines (figura 34).

INTRODUCCIÓN

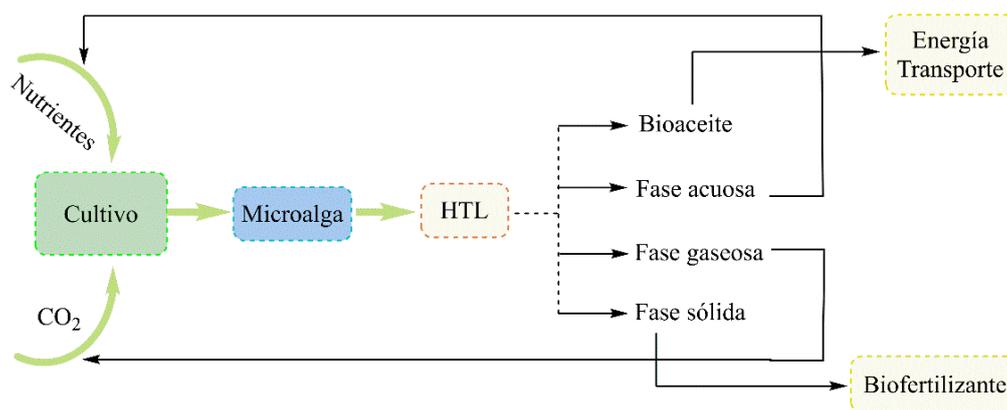


Figura 34. Esquema del proceso de HTL y separación y aplicación de las fases (Elaboración propia).

El bioaceite es el líquido oscuro, viscoso y denso producido a través de la degradación hidrotérmica de los constituyentes de las microalgas (lípidos, proteínas y carbohidratos) [313]. Este tipo de bioaceite tiene un contenido energético del 70-95% con respecto a la gasolina y es de una naturaleza similar a la de un crudo pesado. Cabe destacar que tiene un contenido en oxígeno mucho menor que el bioaceite que se obtiene mediante pirólisis [335].

Las propiedades fisicoquímicas del bioaceite dependen significativamente de la materia prima y de las condiciones de operación del proceso. Se trata de una mezcla compleja de un gran número de compuestos con un amplio rango de peso molecular. El principal problema asociado a estos bioaceites es su alto contenido en oxígeno (10-15% p/p bs) [336], en nitrógeno, que normalmente suele estar entre el 3,9-7% p/p, bs, así como un contenido en azufre del 0,5-1% p/p bs, lo que conlleva emisiones elevadas de SO₂ y NO_x en la combustión [313]. Por lo que este bioaceite requiere de una etapa de hidrotreamiento posterior [337].

La fracción acuosa es una fracción significativa dentro de los productos de HTL. Su composición varía, de igual forma que el bioaceite, según la materia prima y las condiciones de reacción, pero se compone principalmente de agua (y otros codisolventes, si se emplearan) y compuestos orgánicos solubles en agua [338]. En general, los grupos funcionales que caracterizan la fase acuosa son los ácidos carboxílicos (ácido acético, ácido fórmico, etc.), compuestos aromáticos (como el fenol) y alcoholes (etanol, metanol y etilenglicol) y acetona. Además, contiene Mg, K, Fe, Ca, N, P y otros minerales [297]. Por este motivo, numerosos autores han considerado la opción de reciclar esta fase a la etapa del cultivo de las microalgas [313,339].

Los sólidos insolubles son otros subproductos obtenidos a partir del proceso de HTL. El mecanismo de formación de este *biochar* aún no está claro, pero en numerosos trabajos proponen que se forma por reacciones de polimerización adicionales de la fracción del bioaceite a tiempos de residencia más largos [338]. Esta fracción tiene un alto contenido en cenizas y muy poco hidrógeno, azufre y nitrógeno. Como ejemplo, Jena y colaboradores [340] publicaron que tras

someter a la cianobacteria *Arthrospira platensis* a licuefacción hidrotérmica, a 350°C y un tiempo de reacción de 60 minutos, la composición elemental de ese residuo sólido fue de: 11,82% C, 1,81% H, 1,41% N, 0,61% S y 84,41% O. Normalmente casi todos los rendimientos a sólidos suelen ser inferiores al 10% y pueden ser utilizados como materia para procesos termoquímicos posteriores, como la pirólisis o la gasificación mientras que las cenizas restantes suelen contener algunos nutrientes, por eso puede ser útil para usarlo como fertilizante o como nutrientes para el crecimiento de microalgas [313].

La última fase de los productos de HTL es la fase gaseosa, compuesta principalmente por CO₂ con fracciones pequeñas de CO, H₂ y CH₄. Estos compuestos se generan mediante reacciones de descarboxilación y craqueo de la biomasa durante la licuefacción hidrotérmica [338]. El CO₂ producido en esta fracción puede ser recirculado a la etapa de cultivo de la microalga, mientras que el H₂ se puede usar para realizar el hidrotratamiento antes mencionado al bioaceite producido. Esta fracción suele representar un rendimiento de aproximadamente del 20% de la materia orgánica que había en la microalga de partida, y resulta muy prometedora desde el punto de vista de una biorrefinería [313].

1.3.3.2. Mecanismo de reacción

En general, en numerosos estudios se puede concluir que el proceso de HTL de microalgas intervienen dos reacciones: la hidrólisis y la repolimerización [341]. La biomasa de microalgas, en primer lugar, se hidroliza para formar compuestos de pequeño peso molecular. Dichas moléculas despolimerizadas son altamente reactivas, por lo que se repolimerizan y condensan dando como resultado los intermedios de las diferentes fases finales (fase sólida, biocrudo, que es mayoritario, una fase acuosa y una fase gaseosa). La repolimerización y condensación de los intermedios de las distintas fases pueden verse favorecidas con el incremento de la temperatura de reacción y el tiempo de residencia, entre otros [342].

No se conoce en profundidad como influyen cada uno de los compuestos de la microalga en el proceso de HTL, aunque se puede afirmar que los lípidos, las proteínas y los carbohidratos intervienen de forma positiva en la estabilidad térmica del biocombustible [342]. Por ejemplo, López - Barreiro y colaboradores [313] estimaron el rendimiento del bioaceite de dos microalgas, a través de la ecuación creada por Biller y Ross [333], para las que ya se habían estudiado sus rendimientos de forma experimental en otros trabajos previos. El rendimiento estimado del bioaceite fue mucho mayor para la microalga con mayor contenido lipídico. Sin embargo, el rendimiento obtenido de forma experimental fue similar para ambas microalgas, ya que no sólo afecta su composición bioquímica, sino que también afectan otros parámetros como la rigidez de la pared celular. Parece entonces que los diferentes componentes de las microalgas no se comportan de forma independiente durante el proceso de HTL y su contribución al rendimiento

INTRODUCCIÓN

global no puede considerarse una adición lineal, sino más bien como una interacción entre ellos por medio de reacciones entrecruzadas, como, por ejemplo, reacciones de Maillard entre carbohidratos y proteínas o de condensación entre los productos de degradación de lípidos y proteínas.

Durante el proceso de HTL, las proteínas, que son polímeros formados por aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, se hidrolizan rápidamente. A partir de estos aminoácidos se producen reacciones simultáneas de descarboxilación y de desaminación. Como resultado de estos dos tipos de reacciones, se liberan compuestos en la fase orgánica, tales como aminas y nitrilos, o en la fase acuosa, tales como amoníaco y algunos aminoácidos [313]. Los lípidos se hidrolizan para producir glicerol y ácidos grasos de cadena larga. El glicerol se convierte en metanol, acetaldehído, propionaldehído, etanol y formaldehído, que pasarán a formar parte de la fase acuosa, y en productos gaseosos, principalmente CO, CO₂ y H₂. Los ácidos grasos tienen una mayor estabilidad térmica, pero pueden ser convertidos en hidrocarburos de cadena larga, que pasarían a formar parte de la fase orgánica o bioaceite.

Por todo lo expuesto anteriormente se puede concluir que el proceso de HTL es muy complejo y que no siempre se puede correlacionar de forma exitosa la composición bioquímica de las microalgas con la producción de bioaceite. El esquema general del proceso de HTL se presenta en la figura 35 en base a resultados experimentales y estudios previos.

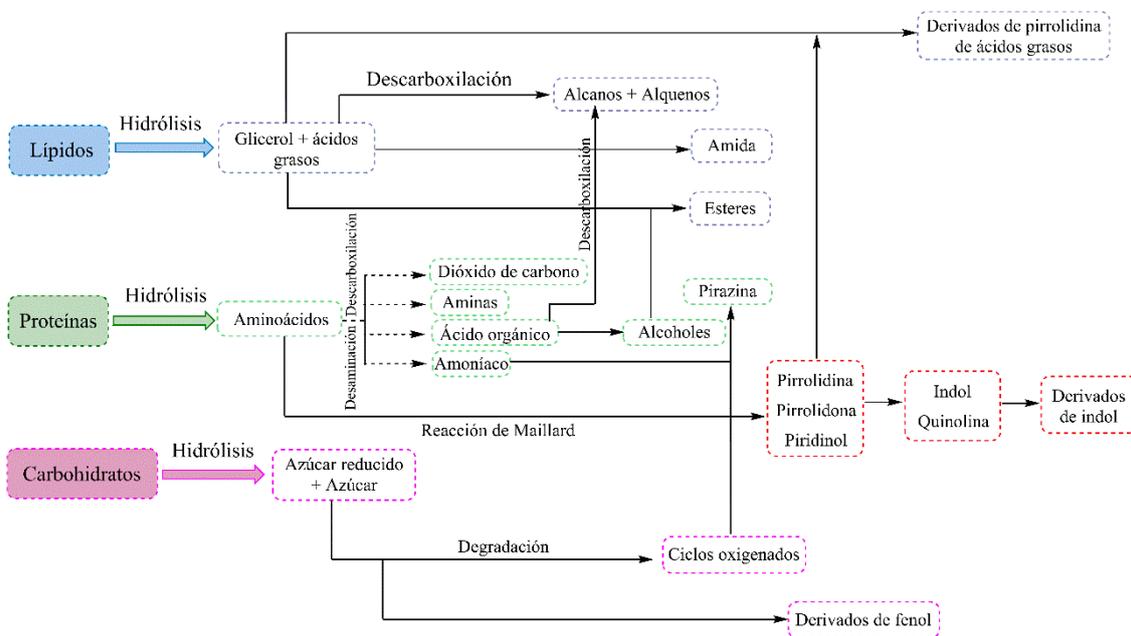


Figura 35. Mecanismo de reacción de la licuefacción hidrotérmica (modificado de [81,341]).

Y, por último, los productos obtenidos a partir de la degradación directa de los carbohidratos no se convierten en bioaceite. Se cree que el principal mecanismo de licuefacción ocasiona que los carbohidratos se hidrolicen y se descompongan en compuestos orgánicos

polares, solubles en agua, como ácidos orgánicos, aldehídos, compuestos bencénicos y alcoholes, que pasan a formar parte de la fase acuosa. Las estructuras del tipo aldehído y benceno pueden producir hidrocarburos de mayor tamaño, que luego forman parte de la fracción del bioaceite [313,341].

1.3.3.3. Factores que afectan al proceso HTL

Como ya se ha mencionado, actualmente no se conoce en detalle el mecanismo de licuefacción hidrotérmica. La influencia de varios factores como la temperatura, la concentración del catalizador (homogéneo o heterogéneo) en el caso de que esté presente, el tiempo de reacción, la composición bioquímica de las microalgas, la relación microalga:agua; no está del todo esclarecida [313].

Un factor clave a tener en cuenta en el proceso de HTL es la biomasa de partida. La composición de las microalgas es muy variable entre especies e, incluso, varía dentro de la misma especie según las condiciones de cultivo que afectan muy significativamente a las características y a la composición bioquímica de las microalgas. Por ello, las condiciones de cultivo y la selección de cepas son muy importantes ya que condicionan la composición de las microalgas y, por lo tanto, el bioaceite obtenido. Biller y Ross [333] estudiaron el proceso de licuefacción hidrotérmica con diferentes compuestos modelo que representaban la fracción de lípidos, proteínas y carbohidratos de las microalgas para esclarecer el efecto que tienen cada uno de ellos en el bioaceite obtenido. Estos resultados los compararon con el proceso de HTL de ciertas especies de microalgas con lo que propusieron que las eficiencias de conversión hacia la formación de bioaceite seguían la siguiente tendencia: lípidos (55-80%), proteínas (11-18%) y carbohidratos (6-15%). Sin embargo, también hay estudios publicados que describen altos rendimientos a bioaceite con microalgas con bajo contenido lipídico [343].

De igual forma, encontrar la temperatura y la presión óptimas para el proceso de licuefacción hidrotérmica no es tarea fácil ya que ambas están relacionadas, de forma que, cuando aumenta la temperatura, aumenta la presión correspondiente [342]. Tanto la conversión como el rendimiento a bioaceite dependen significativamente de la temperatura de reacción en el rango de 300-380°C. A medida que la temperatura aumenta, tanto el rendimiento de bioaceite como de la fracción gaseosa aumentan; sin embargo, el contenido de compuestos orgánicos disueltos en agua y el rendimiento de la fracción sólida disminuyen [344]. Además, con el aumento de la temperatura de reacción, la concentración de N en el bioaceite aumenta, mientras que la del O disminuye. Esto está relacionado con que a mayor temperatura se consigue una conversión más completa del componente proteico de las microalgas.

Sheehan y colaboradores [317] demostraron que, para microalgas ricas en proteínas, se tienen mayores rendimientos a bioaceite incluso en condiciones suaves de HTL, alrededor de

INTRODUCCIÓN

250°C, ya que la incorporación de los productos derivados de las proteínas en el bioaceite es rápida. En condiciones más severas, por encima de 370°C los rendimientos a bioaceite disminuyen a medida de que estas moléculas se transforman en compuestos solubles de la fase acuosa o en productos gaseosos [317]. Por otro lado, para una microalga rica en carbohidratos se requieren temperaturas más severas (>350°C) para lograr un mayor rendimiento hacia el bioaceite, ya que dicha biomasa es menos propensa a producir bioaceite. Y, por último, con respecto a una microalga rica en lípidos, se obtuvieron altos rendimientos a bioaceite para una gran variedad de condiciones de HTL. Pero en condiciones de reacción más severas ($T > 380^\circ\text{C}$), los rendimientos a bioaceite disminuyen con el aumento del tiempo ya que se forman los productos de la fase acuosa y gaseosa. Por todo ello, se esperan altos rendimientos a bioaceite para microalgas con un alto contenido en lípidos y proteínas.

Numerosos trabajos han podido corroborar que los rendimientos a bioaceite se ven afectados de forma significativa por la proporción relativa de biomasa y agua que se emplee. Aunque disminuir esta relación puede conducir a un mayor rendimiento a bioaceite, el uso de una gran cantidad de agua no es económico, ya que consume más energía. Por lo tanto, se ha establecido una relación óptima biomasa:agua de 1:10 (p/p), que será la utilizada en la presente tesis doctoral en el proceso de HTL [345].

Otro de los factores que determina los productos de HTL, es el tiempo de reacción. Éste es el tiempo durante el cual se mantiene la temperatura de reacción constante, en el valor deseado, aunque lógicamente el tiempo de calentamiento (tiempo que tarda en alcanzarse la temperatura deseada) también tiene influencia en la composición y el rendimiento a bioaceite. La mayoría de los estudios sugieren que el rango de tiempo para el HTL está entre 30-60 min. Cabe destacar que el tiempo es un factor que afecta enormemente a los costes asociados al proceso. También se puede concluir que un tiempo de reacción prolongado puede conducir a reacciones secundarias, que generen gases, residuos sólidos y productos solubles, lo que reduce el rendimiento del bioaceite, mientras que tiempos de reacción cortos, implican un menor consumo y, generalmente, el rendimiento a bioaceite suele ser mayor [342].

Por lo general, el proceso de HTL se lleva a cabo de manera efectiva en condiciones subcríticas para el agua, la cual actúa como catalizador en el medio hidrotermal. Aunque también se pueden utilizar muchos disolventes junto con el agua, los denominados “*cosolventes*”, tales como alcoholes (etanol, metanol, isopropanol, glicerol, etc.) [342,346,347]. En la presente tesis se han utilizado cosolventes en el proceso de HTL, esto se desarrollará con más detalle en el apartado 1.3.3.5.

1.3.3.4. HTL de residuos de microalgas

Una limitación importante del proceso de HTL de microalgas o cianobacterias es su alto contenido en proteínas, lo que da como resultado un alto contenido en nitrógeno en el bioaceite, producto final del proceso. En la medida de lo posible, esto se intenta evitar ya que la combustión de este bioaceite daría lugar a la formación de NO_x (óxidos de nitrógeno) que son altamente tóxicos y nocivos para el medio ambiente. Parimi y colaboradores [348] pudieron comprobar que a partir de la biomasa residual de *Arthrospira platensis*, la cual es conocida por tener un alto contenido en proteínas, una vez extraídas éstas, el bioaceite obtenido a partir del HTL contenía una menor proporción de nitrógeno y un mayor contenido de hidrocarburos de cadena larga y ácidos grasos, en comparación con el bioaceite obtenido de la biomasa completa. Por ello, en la presente tesis doctoral, aparte de revalorizar la biomasa residual obtenida tras la extracción de ficocianina, también se tiene como objetivo conseguir producir un bioaceite mejorado, con un menor contenido en nitrógeno.

1.3.3.5. Uso de cosolventes

El alto contenido de humedad y el pequeño tamaño de partícula de las microalgas hacen que el proceso de HTL sea una técnica de conversión muy adecuada para producir bioaceite. Debido a su disponibilidad, su coste económico y los factores ambientales viables, el agua se ha utilizado ampliamente como medio de licuefacción en el proceso. Sin embargo, se ha demostrado que el proceso de HTL llevado a cabo en diferentes mezclas de agua con disolventes orgánicos como alcoholes (metanol, etanol, isopropanol, etilenglicol, glicerol, etc.), fenol, acetona, tolueno y otros, mejoran el rendimiento a bioaceite y retardan la formación de carbón para numerosas materias primas (lignocelulósicas, lignina y microalgas), en comparación con el proceso de HTL llevado a cabo con agua [349].

El uso de disolventes orgánicos incrementa significativamente tanto la calidad como el rendimiento a bioaceite [350], Biswas y colaboradores [351] demostraron ese incremento, utilizando alcoholes como el metanol y etanol, para el alga *Sargassum tenerrimum*, alcanzando rendimientos de bioaceite del 22,8 y 23,8% (p/p), respectivamente, mientras que con agua el rendimiento fue de 16,3% (p/p).

Numerosos estudios han informado de que los alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol, butanol y glicerol) mejoran el rendimiento y la calidad del bioaceite y presentan varias ventajas con respecto al agua en el proceso de HTL [352]:

- 1) Permiten operar en condiciones de reacción más suaves debido a sus puntos críticos más bajos.
- 2) Tienen una mejor capacidad de donación de hidrógeno para estabilizar los radicales libres, y reducir la formación de carbón.

INTRODUCCIÓN

- 3) Pueden disolver más moléculas en la fase del bioaceite.
- 4) Tienen una alta reactividad con los ácidos para formar ésteres.

Uno de los alcoholes que mejor funcionan en el proceso de HTL es el isopropanol. Entre los trabajos que utilizan este disolvente, y que estudian la carga máxima del mismo en el reactor, destaca el de Wagner y colaboradores [353] que consideraron limitarlo al 50% en volumen como cosolvente. Esta es la concentración máxima factible que puede emplearse industrialmente sin requerir un secado excesivo de la biomasa, que obligaría a perder una de las principales ventajas del proceso de HTL. La mejora de los rendimientos de bioaceite cuando se utilizan cosolventes orgánicos se asocia con una mayor solubilidad de los productos orgánicos y la viabilidad de realizar el proceso de HTL en condiciones de reacción más suaves, según las temperaturas y presiones críticas del solvente orgánico seleccionado [349]. También se ha sugerido que las capacidades de donación de hidrógeno de ciertos solventes pueden mejorar los rendimientos del bioaceite y se cree que estos disolventes actúan como agentes de hidrogenólisis (una combinación de deshidratación e hidrogenación) para despolimerizar la biomasa [349]. De igual forma, ese aumento en el rendimiento está asociado a la capacidad que tienen los alcoholes para extraer los lípidos de forma más eficaz que el agua y, de esta forma, aumentar de forma considerable el rendimiento a bioaceite. Con respecto a la calidad del bioaceite, el uso de metanol reduce el contenido de O y N en los bioaceites producidos por HTL, en comparación con el proceso de HTL con agua como disolvente [354], mejorando así los poderes caloríficos superiores (HHV).

Debido a que los alcoholes pueden servir tanto como disolventes como reactivos en el proceso de HTL se ha planteado utilizarlos como disolventes puros. Sin embargo, no existe un consenso claro en la literatura sobre los efectos del alcohol puro en los rendimientos o propiedades del biocrudo [349]. De hecho, recientemente, se ha publicado que el uso de alcoholes puros parece no suponer una mejora en el rendimiento y propiedades del bioaceite [355]. Desde un punto de vista energético, el uso de alcoholes puros no resultaría rentable puesto que requiere el secado completo de la materia prima, lo que conlleva importantes penalizaciones energéticas en el proceso de HTL.

En la presente tesis doctoral se eligieron, como cosolventes, los alcoholes metanol, etanol e isopropanol para intentar mejorar tanto el rendimiento a bioaceite como su calidad. Cabe destacar que la mezcla binaria de isopropanol-agua genera una presión autógena más baja que los sistemas de etanol-agua y metanol-agua a la misma temperatura. Por ello, al usar isopropanol como disolvente binario en el proceso de HTL, se puede lograr un rendimiento a bioaceite igual o superior, empleando unas condiciones de reacción (temperatura y presión) menos severas que la de otros sistemas de alcohol-agua y, por lo tanto, se pueden reducir tanto los costes de operación como los costes de equipamiento asociados a los recipientes a presión y tuberías [356].

1.3.4. Producción de biogás a partir de microalgas

El biogás se produce a través de la digestión anaerobia (DA) que es un proceso natural llevado a cabo por un consorcio de múltiples especies de microorganismos y mediante el cual se produce la degradación de la materia orgánica, en ausencia de oxígeno. Tiene lugar en numerosos ambientes como pueden ser el fondo de río, lagunas, pantanos, vertederos y en el sistema digestivo de los animales [357]. En un principio, este proceso se utilizaba para reducir la carga orgánica de residuos, ya que en ambientes naturales se producía la acumulación de materia orgánica que provocaba el agotamiento del oxígeno, por lo que no se podía llevar a cabo el metabolismo aerobio. Sin embargo, en la actualidad, se reconoce como un proceso consolidado y económicamente viable para la producción de energía [358]. El contenido energético del biogás está determinado principalmente por el contenido potencial de metano, que tiene un poder calorífico superior de 39,3 MJ/m³.

Durante la digestión anaerobia, la materia orgánica es transformada en una mezcla de gases conocida como biogás, cuyos principales componentes son metano y dióxido de carbono. Aunque también se producen trazas de nitrógeno, sulfuro de hidrógeno, vapor de agua y amoníaco, dependiendo del origen del sustrato. Cuando finaliza el proceso se obtiene una mezcla acuosa y un residuo sólido, conocido como digerido o digestato, que es rico en nutrientes (nitrógeno) y minerales, que puede ser utilizado como biofertilizante o también se puede destinar para el cultivo de las microalgas [359,360].

El interés de producir biogás a partir de microalgas comenzó hace unos 60 años. Sin embargo, los primeros experimentos registrados mostraron rendimientos a biogás relativamente bajos y esto se atribuyó a dos motivos principales: las robustas paredes celulares de las microalgas, que limitan el acceso de los microorganismos anaerobios para biodegradar la materia orgánica, y la baja relación carbono/nitrógeno (C/N), debida al alto contenido en nitrógeno que presentan numerosas microalgas, como por ejemplo la especie *Arthrospira platensis*, cianobacteria utilizada en la presente tesis doctoral. Esta baja relación C/N supone una limitación para el uso de microalgas en la producción de biogás, debido al alto contenido de nitrógeno que da como resultado la acumulación de amoníaco, que inhibe el crecimiento de bacterias metanogénicas [361]. Tanto los factores que afectan al proceso de digestión anaerobia como los inhibidores del proceso se van a detallar más adelante, en el apartado 1.3.4.2.

Por otro lado, el alto coste operativo y energético asociado al proceso de digestión anaerobia es otra barrera para extender este proceso de forma comercial. Por ello, la biomasa residual de microalgas (BMR) obtenida en procesos de extracción de compuestos de alto valor añadido utilizadas para DA se considera que puede ser una clave prometedora para revalorizar esa biomasa de microalgas y recuperar la mayor cantidad de energía posible [361].

1.3.4.1. Productos que se obtienen y etapas del proceso

La digestión anaerobia es un proceso que se lleva a cabo en 4 etapas (figura 36) y en el que se encuentran involucradas varios tipos de bacterias y arqueas.

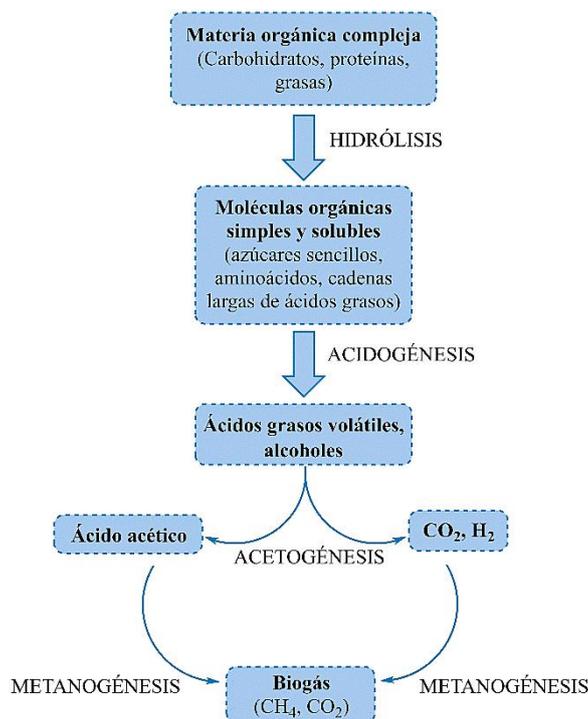


Figura 36. Etapas de la digestión anaerobia (modificado de [326,362]).

La biomasa normalmente se compone de compuestos orgánicos de elevado peso molecular como las proteínas, lípidos y carbohidratos. Como se muestra en la figura 36 la hidrólisis es la primera etapa dentro del proceso de digestión anaerobia, y consiste en hidrolizar las macromoléculas orgánicas que conforman el material a degradar y fragmentarlas en moléculas mucho más pequeñas como aminoácidos, ácidos grasos y azúcares más sencillos [363,364]. Estas macromoléculas se hidrolizan a través de enzimas hidrolíticas liberadas al medio por las bacterias hidrolíticas. Éstas son microorganismos facultativos, es decir, pueden desarrollarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Algunos de los microorganismos comúnmente implicados en este proceso pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Staphylococcus* [364,365].

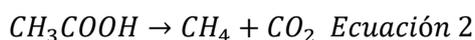
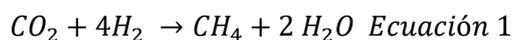
Algunos de los productos de la hidrólisis, como pueden ser el hidrógeno y el acetato pueden ser utilizados en la etapa metanogénica, que se desarrollará más adelante en el proceso de digestión anaerobia. Aun así, la mayoría de las moléculas resultantes de la hidrólisis son todavía relativamente grandes (aminoácidos, ácidos grasos, monosacáridos) que deben descomponerse aún más en el siguiente proceso denominado acidogénesis para poder ser utilizadas para generar metano [363].

INTRODUCCIÓN

La acidogénesis es el siguiente paso del proceso de digestión anaerobia. Los microorganismos hidrolíticos y acidogénicos crecen diez veces más rápido que los metanogénicos [365]. Esta reacción generalmente es la más rápida dentro de la conversión anaeróbica de materia orgánica compleja. Durante esta fase los microorganismos acidogénicos fermentativos (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*) [365] descomponen aún más la biomasa y los productos orgánicos después de la hidrólisis. Estas bacterias fermentativas generan un ambiente ácido en el depósito digestivo mientras crean NH₃, H₂, CO₂, H₂S, ácidos grasos volátiles de cadena corta y ácidos orgánicos, así como otros subproductos. Los principales ácidos producidos son el acético, el propiónico y el butírico [362].

Las bacterias acetogénicas, que intervienen en la siguiente etapa acetogénica de la digestión anaerobia, son anaerobias estrictas, tienen un pH óptimo de alrededor de 6 y se encuentran en hábitats anóxicos. Son de crecimiento lento, sensibles a los cambios de las cargas inorgánicas y cambios ambientales, por ello, requieren largos períodos de latencia para adaptarse a nuevas condiciones del entorno [365]. Estos microorganismos transforman muchos de los productos creados en la acidogénesis en ácido acético adicional, con la producción en paralelo de CO₂ y H₂ [363]. De forma general, la acetogénesis consiste en la creación de acetato, un derivado del ácido acético, a partir de fuentes de carbono y energía por bacterias acetogénicas (*Syntrophomonas wolfeii*, *Syntrophobacter wolinii*) que descomponen la biomasa hasta el punto en el que los metanógenos pueden utilizar gran parte del material restante para crear metano.

Por último, se lleva a cabo la última etapa del proceso donde se produce la metanogénesis del ácido acético, hidrógeno y CO₂. Los organismos metanogénicos de la digestión anaerobia pertenecen al dominio arquea (*Archaea*) y pueden ser metanógenos acetoclásticos o metanógenos hidrogenotróficos. Los acetoclásticos generan metano por descarboxilación de acetato y producen metano y CO₂, pero muy pocas especies son capaces de esto, entre las que pueden realizarlo se encuentran *Methanosarcina barkeri* o *Methanococcus mazei* [326]. La mayoría de los microorganismos metanogénicos son capaces de consumir hidrógeno y CO₂ para producir metano (Ecuaciones 1 y 2).



1.3.4.2. Factores que afectan al proceso

Como ya se ha mencionado anteriormente, la producción de biogás a partir de las microalgas es limitada debido a su baja biodegradabilidad y su alto contenido proteico. Para determinar tanto la biodegradabilidad final como el rendimiento de conversión de metano de diversos sustratos orgánicos, el ensayo de potencial bioquímico de metano (BMP) constituye una

INTRODUCCIÓN

herramienta muy útil [366]. Se ha estudiado en numerosas ocasiones la aplicación de pretratamientos para provocar la ruptura de la pared celular; por otro lado, la adición de diferentes cosustratos también puede mejorar el proceso de DA (ver *apartado 1.3.4.4*). Caben destacar diversos factores que afectan a la DA como la relación C/N, tipo de pretratamiento, pH inicial, temperatura, tiempo de retención hidráulico y tipo y contenido de nutrientes, entre otros.

Nutrientes y relación C/N

Como cualquier otro ser vivo, los microorganismos involucrados en el proceso necesitan de nutrientes para su crecimiento y para el desarrollo de las actividades metabólicas. Existen dos tipos de nutrientes: los macronutrientes, entre los que destacan el nitrógeno, el fósforo y el azufre, y los micronutrientes como son: el Ca, Mg, Na, Fe, K, Ni, Co, Mo, Zn, Cu, entre otros. Dos de los nutrientes más importantes son el carbono (C) y el nitrógeno (N) y la relación C/N es un factor crítico para la elección de la materia prima. Tanto las aguas residuales domésticas como los desechos de animales son ejemplos de materiales ricos en nitrógeno, necesario para el crecimiento de los organismos anaeróbicos. Por otro lado, también existen materiales pobres en N como lo son los residuos agrícolas y la hierba verde, y ricos en carbohidratos que también son importantes para la producción de gas. El rendimiento de biogás disminuye con relaciones C/N por debajo de 20, debido a que se produce un gran desequilibrio y se liberan grandes cantidades de nitrógeno que se acumula en forma de NH_3 , que, en elevadas proporciones, incrementa el pH y, cuando éste aumenta, afecta al crecimiento y metabolismo de las bacterias [362]. Para poder obtener una digestión óptima la relación C/N deber ser cercana a 30 (entre 15-30) [361,363]. De forma general, en las microalgas suele haber una relación C/N de 10/1 [367] y es similar en los residuos, por ejemplo, tras la extracción de proteínas, se han señalado relaciones C/N próximas a 5 [368], por este motivo, en el caso concreto de las microalgas se suelen añadir materiales ricos en carbono y así mejorar la digestión (ver *apartado 1.3.4.4*).

Por el contrario, si la relación C/N es demasiado alta, los metanógenos consumen rápidamente el nitrógeno para cumplir con sus requerimientos de proteínas y ya no estarían disponibles para reaccionar con el contenido de carbono restante, por ende, la producción de biogás también se reduciría [362].

pH

El pH es un parámetro muy importante en la digestión anaerobia, cualquier variación en el mismo puede afectar de forma significativa a la estabilidad del proceso y a la actividad bacteriana, particularmente a la de los metanógenos. Además, el pH se correlaciona con la eficiencia de producción de metano, ya que cuando se forma CH_4 , el pH se neutraliza naturalmente [369]. Como ya se ha tratado con anterioridad, el proceso de DA consta de cuatro etapas, la hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, y como cada etapa es realizada

INTRODUCCIÓN

por diferentes especies de bacterias, se requerirán diferentes condiciones ambientales en cada una de ellas. La hidrólisis, la acidogénesis y la acetogénesis se realizarán mejor en un rango de pH de 4,5 a 6. Por otro lado, los metanógenos son más vulnerables y sus condiciones óptimas se encuentran en un rango de pH de 6 a 8 [361].

Se considera que el valor óptimo del pH para la DA es 6,5-7,5 [361]. Cuando el pH aumenta por encima de 7,5 la formación de amonio se ve favorecida y, con ello, se inhibe el crecimiento microbiano.

Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros más importantes en el proceso de DA. Para que el proceso de DA sea un proceso optimizado y estable, el digestor se ha de mantener a temperatura constante, ya que cambios bruscos pueden afectar a la actividad bacteriana [370].

En teoría, la degradación anaerobia puede tener lugar entre 0 y 100°C [371]. Las condiciones de temperatura dentro del digestor pueden clasificarse en tres tipos: psicrófila (<25°C), mesófila (30-40°C) y termófila (>50°C). De forma general no se suele operar en el rango psicrófilo ya que la actividad bacteriana es muy baja y, por lo tanto, también lo es la biodegradación y la producción de metano. A mayor temperatura se obtienen mayores tasas de degradación, por lo que, de forma general, la digestión termófila suele ser una degradación más rápida y con mayores producciones de metano. Gracias a esto, el digestor podría reducirse en su tamaño y obtener los mismos o mejores rendimientos a biogás que en condiciones mesofílicas. Pero las condiciones termofílicas presentan un inconveniente que es el elevado consumo de energía debido a la elevada temperatura que hay que mantener, por lo que el incremento en la producción de metano no suele compensar el incremento de energía requerida. Otros inconvenientes que se presentan en dicho rango de temperatura son que el proceso es más inestable, se produce una mayor acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV), mayor toxicidad por amonio y mayor sensibilidad a cambios de temperatura. Por ello, la digestión mesófila es la más empleada a escala industrial debido a que es la más estable [372].

Relación sustrato:inóculo

La relación sustrato:inóculo es un parámetro clave que afecta al potencial bioquímico de metano (BMP). Establecer la óptima relación para un residuo específico puede ayudar a establecer un protocolo de puesta en marcha de digestores anaerobios continuos, y optimizar esta etapa de operación crítica. Como la concentración del sustrato en el ensayo BMP afecta a la biodegradabilidad final y a la productividad del metano; una concentración excesiva de sólidos dificulta la mezcla adecuada y podría generar inhibición por acumulación de ácidos grasos [366], generándose menos metano. Por otro lado, las concentraciones bajas de sustrato aumentan de

forma significativa los costes de calentamiento del proceso y requieren volúmenes de digestor más grandes. Por lo tanto, se ha llegado a la conclusión que la relación óptima de sustrato:inóculo ha de ser 1:2 [366].

Inhibidores

Se identifican algunos cuellos de botella para digerir las microalgas de forma anaeróbica. Los factores inhibitorios causan un cambio adverso en la población microbiana o limitan el crecimiento bacteriano. Por ello, la inhibición se suele detectar en una reducción de la tasa de producción de metano y por la acumulación de ácidos orgánicos. Algunos factores de inhibición pueden ser reducidos por varias operaciones, como pueden ser el pretratamiento del sustrato o la codigestión con otro material. Por otro lado, aclimatar la comunidad microbiana al digestor puede mejorar también el rendimiento a metano [373].

El amoníaco es una fuente importante de nitrógeno para las bacterias, de forma que a bajas concentraciones de amoníaco (menos de 200 mg/L) la presencia de éste resulta beneficiosa para el proceso. Pero conforme va aumentando la concentración de amoníaco se puede observar que la actividad de las bacterias metanogénicas disminuye. El amoníaco libre parece ser la causa principal de la inhibición porque causa desequilibrio de protones y/o deficiencia de potasio. Un aumento en el pH da como resultado el cambio del amoníaco de forma ionizada a amoníaco libre, y ello conlleva una mayor toxicidad [373]. La inestabilidad del proceso debido al amoníaco, a menudo, causa acumulación de ácidos grasos volátiles que provoca la disminución del pH y, por lo tanto, una disminución en la concentración de amoníaco libre.

El azufre es un elemento requerido por las bacterias metanogénicas, y, además, este grupo de bacterias contienen más azufre que otros grupos de microorganismos anaerobios. El azufre en forma de sulfato o sulfuro puede convertirse en un inhibidor en el proceso de digestión anaerobia. Por otro lado, los ácidos grasos de cadena corta no son tóxicos por sí mismos. Son producidos y utilizados como nutrientes en el digestor. Sin embargo, sus efectos inhibitorios podrían ser indirectos, ya que pueden causar que el pH baje a niveles indeseables. De esta forma los microorganismos metanogénicos no son capaces de metabolizar el acetato producido por los organismos acetogénicos hasta que el número de metanogénicos haya aumentado lo suficiente, lo que conlleva una producción menor de metano [373].

1.3.4.3. Digestión anaerobia de residuos de microalgas

La extracción a gran escala de productos de alto valor añadido a partir de microalgas, ya sean pigmentos (como en la presente tesis doctoral), proteínas o lípidos, junto con los propios procesos de obtención de biocombustibles generan una gran cantidad de residuos orgánicos que requieren un tratamiento adecuado [374]. Esto, unido a que la extracción de compuestos

bioactivos puede no ser un proceso económicamente sostenible por sí mismo, impulsa el uso de la biomasa residual de microalga para fines energéticos, como puede ser el biogás [348].

Estos residuos suelen ser ricos en proteínas, lípidos y/o carbohidratos, dependiendo del tratamiento que se le haya realizado a la biomasa previamente y del compuesto que se haya elegido extraer. Además, en numerosas ocasiones la extracción de metabolitos de interés como las ficobiliproteínas, aumenta la biodegradabilidad de la biomasa, puesto que la pared celular en el proceso de extracción se rompe [375]. Aunque el proceso de DA permite la utilización de todas las biomoléculas (carbohidratos, proteínas y lípidos), se debe tener en cuenta que cuanto mayor sea el contenido lipídico de la microalga, mayor será la producción de metano [375], seguido del contenido de proteínas y, por último, de carbohidratos.

Por otro lado, se ha podido comprobar que se puede conseguir una reducción de costes y maximizar la producción mediante un sistema integrado de extracción de ficobiliproteínas y producción de biogás, ya que, no solo se aprovechan la biomasa residual generada del proceso de extracción de ficocianina, sino que el efluente de la DA se puede emplear para el cultivo de las microalgas [374].

1.3.4.4. Uso de cosustratos

Como ya se ha mencionado, la relación C/N en los digestores influye de forma significativa en el rendimiento y en la producción de biogás. Esta relación suele ser baja para el caso de las microalgas, ya que tienen alto contenido en nitrógeno y por ello, se produce un desequilibrio entre el C y el N en el reactor y se libera una gran cantidad de nitrógeno amoniacal y/o ácidos grasos volátiles (AGV) en el proceso de digestión anaerobia, lo cual causa un efecto inhibitorio en la producción de biogás. Por lo tanto, de forma general, se requiere una alta relación C/N para una alta eficiencia y rendimiento a biogás. Por ello, una de las opciones para mejorar el proceso es realizar una codigestión con sustratos con alto contenido en carbono [364,376].

Por ejemplo, los sustratos codigeridos con alto contenido en C pueden incluir el estiércol de cerdo [377], estiércol de vaca, desechos sólidos municipales [378], glicerol [379], desechos de papel y grasas ricas en lípidos y aceite [364]. En la presente tesis doctoral se utilizará glicerol, con alto contenido en C, como cosustrato.

1.4. Concepto de biorrefinería. Contexto de la tesis doctoral

La biomasa procedente de las microalgas es una materia prima muy prometedora ya que tiene un elevado potencial para su explotación debido a su elevado contenido en proteínas, lípidos y carbohidratos. Sin embargo, tanto la extracción de compuestos bioactivos de esta biomasa como la producción de biocombustibles a partir de la biomasa residual resultante presentan dificultades que deben ser tratadas para que su comercialización y producción sea factible. De forma paralela,

INTRODUCCIÓN

se ha comprobado que los costes de producción de los biocombustibles, por sí solos, no son económicamente viables, por lo que se han de implementar otros procesos como, por ejemplo, aislar proteínas, carbohidratos o pigmentos, para las industrias química, cosmética y alimentaria, que tengan un valor suficiente como para que sean económicamente viables. De esta forma, se puede conseguir la revalorización de la biomasa residual de microalgas en un concepto de biorrefinería multiproducto (bioproductos y biocombustibles) [380].

Una biorrefinería es una instalación que integra procesos y equipos de conversión de biomasa para producir biocombustibles, energía y productos químicos de valor añadido a partir de la biomasa (figura 37) [381]. El concepto de biorrefinería es análogo al de la refinería de petróleo donde se generan numerosos productos a partir del crudo correspondiente [382]. A diferencia de la refinería de petróleo, que involucra recursos fósiles, el término “biorrefinería” está relacionado con recursos naturales renovables, como vegetales o microalgas. La idea de este nuevo concepto es que cada residuo sea considerado como un nuevo recurso que pueda ser empleado como materia prima en otros procesos productivos.

Por tanto, para la producción de combustibles de tercera generación es necesario desarrollar biorrefinerías que valoricen toda la biomasa y que permitan incrementar las ganancias. En este sentido, se necesita un aprovechamiento integral de la biomasa microalgal para cumplir con el concepto actual de economía circular. Esto es posible ya que, como se ha mencionado, a partir de las microalgas se pueden obtener gran variedad de biocombustibles y otros bioproductos con aplicaciones en la formulación de plásticos, alimentos, fármacos, fertilizantes, cosméticos, etc. [383].

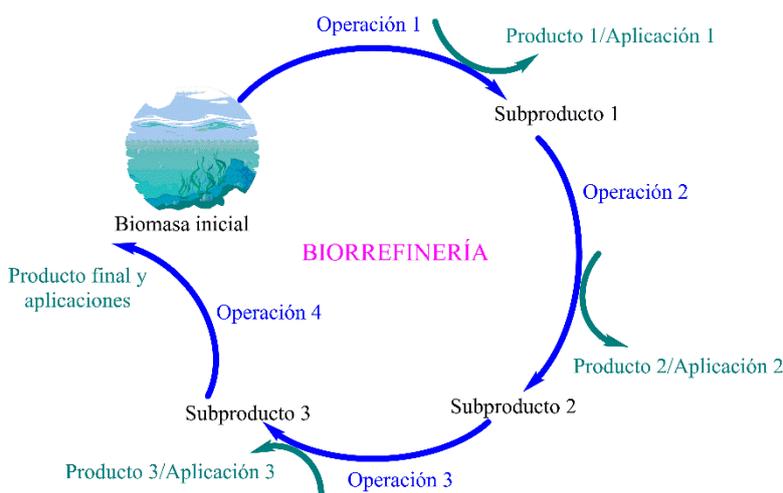


Figura 37. Biorrefinería (modificado de [382]).

En el pasado, las biorrefinerías se clasificaban en base a una gran variedad de criterios tales como [384]:

INTRODUCCIÓN

- Estado de implementación tecnológica: biorrefinerías convencionales y avanzadas; biorrefinerías de primera, segunda y tercera generación.

- Tipos de materias primas utilizadas: biorrefinerías de cultivo integral, biorrefinerías oleoquímicas, biorrefinerías de materias primas lignocelulósicas, biorrefinerías verdes y biorrefinerías marinas.

- Tipos de productos intermedios principales que se producen: biorrefinerías de plataforma de gas de síntesis y biorrefinerías de azúcares plataforma.

- Principales tipos de procesos de conversión aplicados: biorrefinerías termoquímicas y biorrefinerías bioquímicas.

Sin embargo, faltaba un sistema de clasificación inequívoco, por ello, en 2008, *IEA Bioenergy Task 42* desarrolló un sistema de clasificación de biorrefinería más apropiado. Este sistema se basa en una representación esquemática desde la biomasa completa hasta los productos finales y consta de cuatro características principales que pueden identificar clasificar y describir los diferentes sistemas de biorrefinería, a saber: moléculas plataforma, productos (energía y materiales y productos químicos de base biológica), materias primas y procesos de conversión (figura 38). Las plataformas (azúcares, gas de síntesis o biogás) son productos intermedios que pueden conectar diferentes sistemas de biorrefinerías y sus procesos. El número de plataformas implicadas indica la complejidad del sistema. Por otro lado, los dos grupos de productos de biorrefinería son energía (bioetanol, biodiésel, biocombustibles sintéticos) y productos (químicos, materiales, alimentos y piensos). Los dos grupos principales de materias primas son los “cultivos energéticos” de la agricultura (cultivos de almidón, silvicultura de rotación corta) y los “residuos de biomasa” de la agricultura, silvicultura, el comercio y la industria (paja, corteza, astillas de madera, aceites de cocina, corrientes residuales del procesamiento de biomasa) [384].

En dicho sistema de clasificación se hizo una diferenciación entre cuatro procesos de conversión principales, que incluyen: bioquímico (fermentación y conversión enzimática), termoquímico (gasificación, pirólisis), químico (hidrólisis ácida, esterificación), y procesos mecánicos (prensado, fraccionamiento) (figura 38).

INTRODUCCIÓN

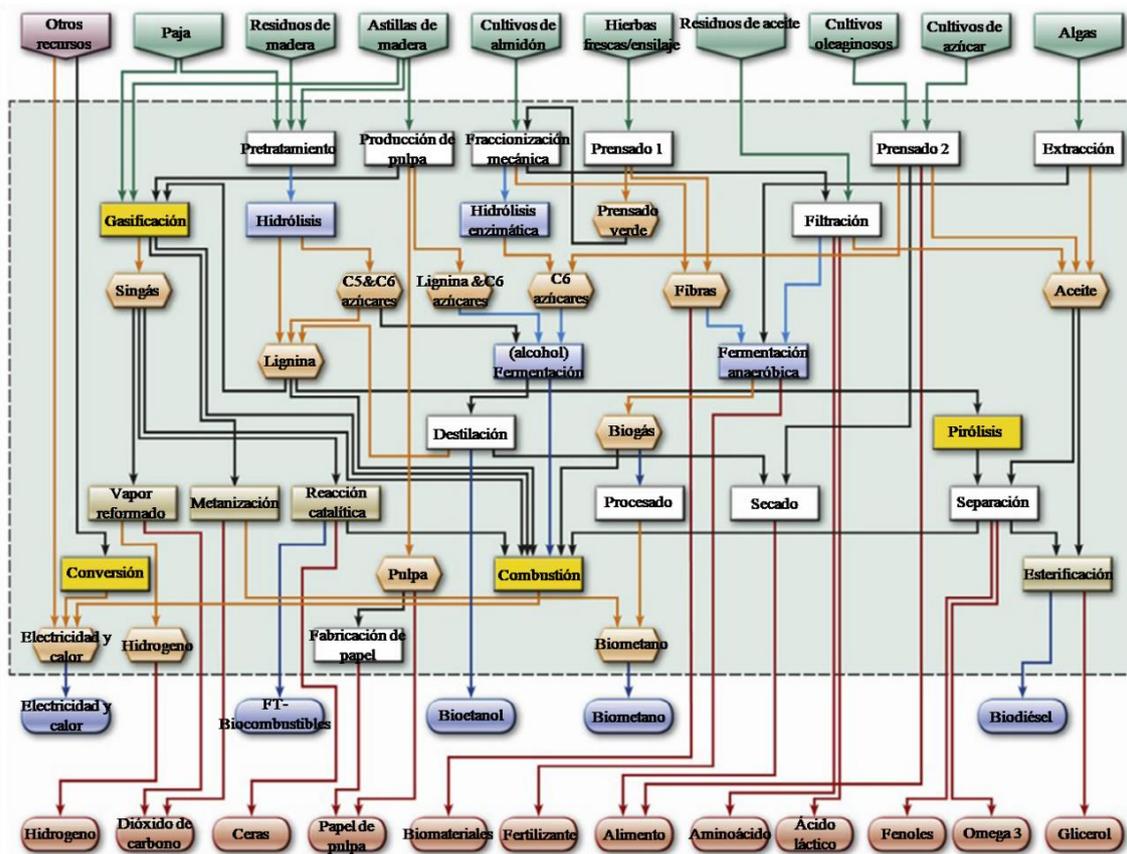


Figura 38. Red en la que se basa el método de clasificación del sistema de biorrefinería (modificado de [384]).

La biorrefinería más avanzada es aquella capaz de utilizar una combinación de materias primas de biomasa y producir diferentes productos empleando una combinación de tecnologías. Como ya se mencionó con anterioridad, en el caso de las microalgas, se puede basar en el principio de extracción de productos de alto valor y bajo volumen (como pigmentos y principios activos) y la valorización de la biomasa residual como productos de bajo valor y alto volumen (biocombustibles). Por ello, la combinación de la extracción de ficocianina, estudiada en la presente tesis doctoral, junto con la producción de biocombustibles, también analizados en la presente tesis, resulta imprescindible para que el proceso sea tanto económica como medioambientalmente viable, en el ámbito de una economía circular. Como en el proceso global se produce una mezcla de productos, los productos de alto valor son los responsables de la viabilidad económica del proceso mientras que los de bajo valor son los que pueden suministrar o minimizar la demanda energética del sistema [385]. Cabe destacar que la biomasa residual generada se utilizará húmeda para reducir los costes energéticos asociados al secado de la biomasa.

Para las biorrefinerías que se plantearán en el presente trabajo (ver *apartado 3.3*) se realizará una simulación con datos experimentales obtenidos y se llevará a cabo un análisis de

ciclo de vida (ACV) para evaluar el impacto ambiental de cada una de ellas y poder concluir cuál de las dos resulta medioambientalmente más viable.

1.4.1. Análisis de ciclo de vida

El origen del análisis del ciclo de vida (ACV) surge en EE. UU. y se atribuye a Harry Teasley en 1969 en un marco de estudio patrocinado por Coca-Cola y realizado por el *US Midwest Research Institute*. En ese estudio se compararon varios envases de bebidas para encontrar aquellos que tuvieron un menor consumo de recursos naturales y un menor impacto ambiental [386]. La metodología utilizada se denominó análisis del perfil ambiental y de recursos (REPA) y constó de los siguientes pasos:

- (1) Identificación de los materiales y productos a ser estudiados.
- (2) Definición detallada del diagrama de flujo del sistema.
- (3) Balances de materiales y energía.
- (4) Evaluación del consumo de recursos naturales.
- (5) Evaluación de emisiones ambientales.

Los datos necesarios para implementar dicha metodología incluyeron lo siguiente: materias primas, uso del agua, energía y recursos materiales, energía del proceso y energía de transporte, emisiones al aire, desechos transportados por el agua y desechos sólidos [386]. En lo que se refiere a la evaluación del desempeño ambiental, la falta de armonización entre los métodos no permite una comparación justa entre productos, procesos y sistemas. Uno de los objetivos de la estandarización que comenzó a principios de la década de 1990 fue establecer pautas comunes para profesionales e investigadores. Con ello se consiguió que la forma de trabajo fuese lo suficientemente objetiva y sistematizada ya que se actualmente se encuentra regulada por la *International Organization of Standardization*, ISO (ISO 14040:2006) (figura 39).

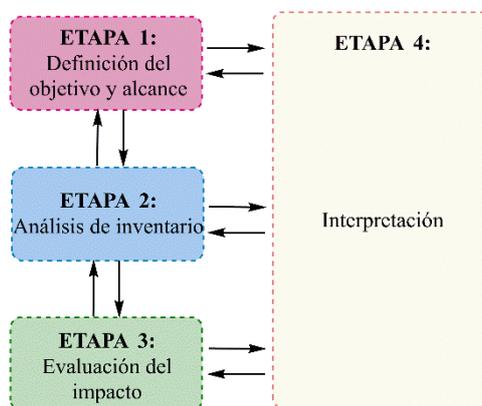


Figura 39. Estructura actual de acuerdo con la norma ISO 14040. Modificado de [381].

Como se ha mencionado, el análisis del ciclo de vida dentro de un marco de biorrefinería estudia cuales de los procesos que intervienen en dicha biorrefinería generan un alto impacto

INTRODUCCIÓN

ambiental o demandan gran cantidad de energía, lo cual no es ni medioambiental ni económicamente viable.

Un entorno de biorrefinería técnicamente viable debe estar relacionado con un balance energético positivo, y las etapas de secado de biomasa, la recolección por centrifugación o la extracción de lípidos asistida por microondas implican altos requerimientos energéticos [387]. Por lo que es importante tener en cuenta que la cosecha de microalgas es un punto crítico en su uso como materia prima para un tipo de biorrefinería enfocada a productos relacionados con la energía. Según los resultados presentados por Danquah y colaboradores [388], la concentración de la biomasa determina la demanda energética de las etapas de cosechado y secado; por esta razón, la optimización de la demanda energética es especialmente importante cuando la concentración de células en el sistema de cultivo es baja (por ejemplo, en estanques abiertos). Cuando la concentración de biomasa supera los 9 g/L, las diferencias entre la demanda energética entre las distintas tecnologías de separación como la centrifugación o la filtración de flujo tangencial disminuyen.

Más recientemente, Prétat y colaboradores [389] estudiaron diferentes escenarios de biorrefinerías de microalgas y los analizaron en base a su balance energético. Entre ellos evaluaron la extracción de lípidos y de proteínas junto con la producción de energía mediante digestión anaerobia. Ambos procesos de ruptura celular, tanto para la extracción de lípidos como de proteínas, se llevaron a cabo mediante la técnica de molienda usando un molino de bolas y mediante homogeneización de alta presión. Comparando ambos métodos llegaron a la conclusión de que el molino de bolas requiere tres veces más energía que la homogeneización de alta presión. Sin embargo, existen otros métodos de ruptura celular, como ya se vio en el *apartado 1.2.5*, tales como los métodos convencionales o el tratamiento con ultrasonidos. Con respecto a este último, aparte de considerarse una de las técnicas más apropiadas para obtener compuestos bioactivos de las microalgas, es también una de las técnicas que resulta prometedora en términos de consumo de energía ya que puede reducir drásticamente las entradas de energía en comparación con los métodos tradicionales (congelar-descongelar o molino de bolas) [390], debido a su menor tiempo de operación.

Considerando un enfoque de biorrefinería, el primer paso es la extracción de un producto de alto valor añadido, y la biomasa residual resultante debe ser revalorizada a partir de procesos termoquímicos o bioquímicos. Con respecto a los primeros, cabe destacar la licuefacción hidrotérmica de microalgas (ver *apartado 1.3.3*). Dentro de dicha biorrefinería, el proceso de HTL suele ser bastante limitante debido a la alta demanda energética que tiene, aunque las temperaturas de trabajo por debajo de 350°C pueden disminuir ligeramente las limitaciones energéticas. Sin embargo, la viabilidad económica de este proceso está limitada por el rendimiento

INTRODUCCIÓN

a biocombustible y el coste de la biomasa [391]. Bennion y colaboradores [302] compararon dos rutas termoquímicas de conversión a bioaceite, la licuefacción hidrotérmica (HTL) y la pirólisis. Se cuantificó el impacto ambiental de las dos vías mediante la relación de energía neta (NER), definida como la energía consumida sobre la energía producida, y las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI).

La energía del proceso HTL está dominada por la energía requerida para calentar el reactor, 6,51 MJ (por kg de microalgas); mientras que los aportes energéticos del proceso de pirólisis están dominados por el reactor 7,9 MJ (por kg microalgas) y por la etapa de secado 7,8 MJ (por kg microalgas). Con respecto a los resultados generales la NER de ambos procesos a escala industrial es de 1,24 y 2,28, respectivamente, con lo que son procesos energéticamente desfavorables, (los NER de otros combustibles energéticos como el diésel convencional, el etanol de maíz y el biodiésel a partir de soja son de 0,18, 1,07 y 0,80, respectivamente). Las diferencias existentes entre los NER de los procesos de conversión estudiados son el resultado de las diferencias en la recuperación del bioaceite, los rendimientos de éste y los valores caloríficos.

A escala industrial, la vía HTL tiene un mayor rendimiento másico (37%), en comparación con la vía de pirólisis (29%), pero los datos experimentales mostraron que en la pirólisis el HHV era superior al del bioaceite del HTL. Sin embargo, el mayor rendimiento de bioaceite conseguido con el proceso de HTL compensa su menor densidad de energía.

Como conclusión, los resultados de este estudio [302] muestran que el HTL es más favorable que la pirólisis, principalmente debido a que el HTL puede trabajar con biomasa de microalgas húmeda, mientras que la pirólisis requiere del secado previo de la biomasa, con lo que la etapa de secado necesita una cantidad considerable de energía, representando casi la mitad del NER general para esta vía a escala industrial.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Las microalgas y cianobacterias son materias primas importantes ya que en su interior acumulan numerosos compuestos de alto valor añadido, entre ellos, la ficocianina. Los procesos de extracción, separación y purificación de dicho biocompuesto, necesarios para que adquiera ese alto valor, generalmente están asociados al uso de gran cantidad de disolventes orgánicos lo que supone una gran limitación para su completa comercialización. En este sentido, mediante la presente tesis doctoral se plantea la optimización del proceso de aprovechamiento de la biomasa de cianobacteria para la extracción de ficocianina mediante el empleo de disolventes verdes (como los líquidos iónicos), y, por otro lado, la producción de biocombustibles con propiedades adecuadas a partir de la biomasa residual generada tras la extracción, en un esquema de biorrefinería. De esa forma, el proceso en conjunto será económicamente viable (debido a la extracción y purificación del compuesto bioactivo) y energéticamente autosuficiente.

Por todo lo mencionado anteriormente, los objetivos principales de la presente tesis son:

Extracción y purificación de ficocianina

1. Establecer las condiciones de extracción óptimas que maximicen la cantidad de ficocianina extraída mediante el empleo de líquidos iónicos y ultrasonidos. Dicha optimización se llevará a cabo mediante un diseño de experimentos en el que se evaluarán el efecto de los siguientes factores: concentración de líquido iónico, cantidad de biomasa, potencia y tiempo de ultrasonidos.
2. Evaluación del líquido iónico más adecuado para romper la pared celular de la cianobacteria *Arthrospira platensis*.
3. Recuperación del líquido iónico previamente utilizado en las extracciones de ficocianina y reutilización del mismo en varios ciclos de extracción de dicha ficobiliproteína. Evaluación de la capacidad de extracción de dicho LI reutilizado en cada ciclo de extracción.
4. Análisis del líquido iónico más adecuado en el sistema bifásico acuoso (ATPS) para separar la ficocianina de otros compuestos, evaluando tanto la recuperación de la misma en la fase superior del sistema ATPS, como su pureza.
5. En función de la pureza obtenida, valorar la necesidad de introducir etapas de purificación adicionales como la diálisis y la precipitación con sulfato de amonio. Estudio de la influencia del sistema ATPS mediante dos enfoques de purificación.
6. Análisis de la reutilización del líquido iónico en el sistema ATPS.

Aprovechamiento de la biomasa residual mediante:

Licuefacción hidrotérmica (esquema de biorrefinería 1):

1. Estudio del efecto de la temperatura junto con la adición de cosolventes sobre el rendimiento, la calidad y el contenido de N y O del bioaceite obtenido.
2. Establecer las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento a bioaceite y minimizar el contenido de oxígeno y nitrógeno a partir de la biomasa residual.

Digestión anaerobia (esquema de biorrefinería 2):

1. Evaluación del efecto de la temperatura (condiciones mesofílicas y termofílicas), así como la adición de un cosustrato con el objetivo de producir más metano a partir de la biomasa residual.
2. Analizar la posibilidad de reducir el tiempo del experimento de biodegradabilidad mediante condiciones termofílicas.

Evaluación de los impactos ambientales de las dos biorrefinerías propuestas

1. Diseño y simulación de ambas biorrefinerías mediante el programa SuperPro Designer 9.5. A partir del cual se identifican y cuantifican de las entradas y salidas de ambas biorrefinerías tanto de materia como de energía (tablas de inventario).
2. A partir de las tablas de inventario, se procederá a evaluar los impactos ambientales asociados a cada uno de los procesos incluidos en ambas biorrefinerías mediante SimaPro 7.2. Una vez identificados y cuantificados dichos impactos ambientales se podrá seleccionar el esquema de biorrefinería más adecuado, que menos impacto ambiental genere.

METODOLOGÍA

3. Metodología

En este apartado se incluyen tanto los materiales utilizados en la presente tesis doctoral; organizados según el proceso en el que se han empleado, como las instalaciones experimentales, los procesos experimentales y los métodos de análisis empleados. Toda la experimentación llevada a cabo se ha desarrollado en la Universidad Rey Juan Carlos. Concretamente, la parte de extracción, separación y purificación de ficocianina, junto con el proceso de digestión anaerobia, se ha desarrollado en los laboratorios del Edificio Departamental I, mientras que la revalorización de la biomasa residual mediante HTL se ha realizado en el Centro de Apoyo Tecnológico (CAT), en la zona de bunkers.

3.1. Etapas del proceso

3.1.1. Extracción de ficocianina

❖ Materiales

Los materiales y reactivos utilizados en esta parte fueron:

- Biomasa liofilizada y seca de la cianobacteria *Arthrospira platensis* (AlgaEnergy S.A, Alcobendas, España).
- Líquidos iónicos apróticos de la familia imidazolio:
 - [EMIM][EtSO₄] ≈ [C₂MIM][EtSO₄] (etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).
 - [BMIM][MeSO₄] (metilsulfato de 1-butil-3- metilimidazolio) (Sigma-Aldrich).
 - [BMIM][Cl] (cloruro de 1-Butil-3-metilimidazolio) (Sigma-Aldrich).

❖ Instalación experimental

La experimentación se desarrolló en un equipo de ultrasonidos Elmasonic P ultrasound (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Alemania) (figura 40) concretamente la mezcla de microalga con disolución de líquido iónico se realizó en tubos de centrífuga de 25 mL tal y como se muestra en la figura 40 (B).

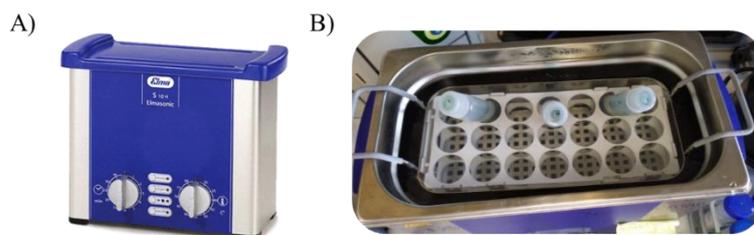


Figura 40. Instalación experimental para la extracción de la ficocianina mediante tratamiento con ultrasonidos (A), equipo de ultrasonidos junto con los tubos de centrífuga (B).

En este equipo se puede trabajar en tres modos: *degas*, *sweep* o *pulse*. El modo de *degas* es apropiado para la desgasificación de muestras y disolventes para HPLC, el modo *sweep* es útil para una distribución uniforme de la potencia ultrasónica en todo el tanque (es el utilizado en la presente tesis doctoral), y el modo *pulse* consiste en dar pulsos de alta potencia cada cierto tiempo. Este equipo permite trabajar a temperaturas en un rango entre 0-80°C, potencias desde 0 hasta el 100% de amplitud (820 W), tiempos de 0-60 minutos y dos frecuencias de trabajo 37 kHz o 80 kHz.

❖ Procedimiento experimental

La extracción de ficocianina de la cianobacteria *Arthrospira platensis* se llevó a cabo mediante un pretratamiento con ultrasonidos. Con el propósito de optimizar la cantidad de ficocianina extraída en el proceso, se planteó un diseño factorial de experimentos del tipo compuesto central en el que se evaluaron los siguientes factores: relación másica LI/agua (concentración del LI), relación másica biomasa/disolvente (B/S), potencia del equipo de ultrasonidos (P) y el tiempo de sonicación (t).

El procedimiento experimental consistió en mezclar la microalga (0,1; 0,35 o 0,6 g) con 10 mL de la disolución de LI en agua a diferentes concentraciones (0, 15 o 30% p/p). La mezcla fue agitada en vortex durante 30 s y después sonicada a diferentes tiempos (10, 20 o 30 minutos) a temperatura ambiente en un equipo de ultrasonidos, a una frecuencia constante de 37 kHz. También se han estudiado diferentes amplitudes de ultrasonidos (40%, 60%, o 80%) teniendo en cuenta que la máxima amplitud (100%) proporciona una potencia máxima de 820 W. Los niveles elegidos para este diseño de experimentos se resumen en la tabla 7. Como siempre se adicionan 10 mL de disolución de LI el factor B/S se simplifica a B (g) (gramos de microalga adicionados para la extracción).

Tabla 7. Resumen de la correspondencia entre valores codificados y reales de los factores experimentales seleccionados para el diseño factorial.

Valor codificado	B (g)	LI/agua (% p/p)	P (%)	t (min)
-1	0,10	0	40	10
0	0,35	15	60	20
1	0,60	30	80	30

Estos factores y niveles fueron seleccionados de acuerdo a estudios previos publicados en bibliografía [124,147].

Después del tratamiento con ultrasonidos, la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Eppendorf Modelo 5910 (Eppendorf. Hamburgo, Alemania). Separando, de esta manera, el extracto crudo de ficocianina de la biomasa residual de *A. platensis*.

Para ver de forma más visual el proceso de extracción de ficocianina, recuperación del líquido iónico y de esa biomasa residual se presenta el correspondiente esquema en la figura 41.

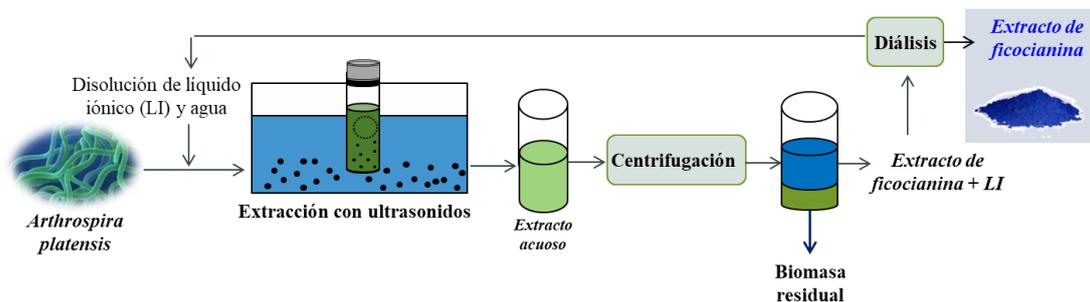


Figura 41. Procedimiento experimental para la extracción de ficocianina.

Análisis estadístico

Para optimizar el proceso de extracción de ficocianina se planificó un diseño compuesto central centrado en las caras con los cuatro factores anteriormente descritos, aplicando posteriormente la metodología de superficie de respuesta. El diseño de experimentos seleccionado consta de 2^4 (16) experimentos factoriales y 8 puntos estrella. Por último, se completó el diseño añadiendo 4 réplicas del punto central para determinar el error experimental. Las respuestas seleccionadas en el proceso de extracción fueron: la cantidad extraída de ficocianina (E_{PC}), aloficocianina (E_{APC}) y ficoeritrina (E_{PE}), así como sus respectivas purzas (P_{PC} , P_{APC} , P_{PE}), junto con la cantidad de carbohidratos extraídos (E_{CH}). Los 28 experimentos de que consta el diseño experimental completo se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Matriz con los valores codificados de los factores del diseño de experimentos compuesto central centrado en las caras.

Experimento	B	IL/agua	P	t
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-1	0	0	0
18	1	0	0	0
19	0	-1	0	0
20	0	1	0	0
21	0	0	-1	0
22	0	0	1	0
23	0	0	0	-1
24	0	0	0	1
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0

Los experimentos se realizaron en orden aleatorio para minimizar tendencias sistemáticas en las variables. El nivel de significación para la diferencia entre las medias fue del 95% (p -valor < 0,05).

3.1.2. Separación y purificación de ficocianina

❖ Materiales

Separación de ficocianina mediante sistema de dos fases acuosas (ATPS)

- Líquido iónico $[C_2MIM][EtSO_4] \approx [EMIM][EtSO_4]$ (etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Líquido iónico $[C_4MIM][EtSO_4] \approx [BMIM][EtSO_4]$ (etilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio) (IoLiTec Ionic liquids Technologies, Heilbronn, Alemania).

- Líquido iónico [C₆MIM][EtSO₄] ≈ [HMIM][EtSO₄] (etilsulfato de 1-hexil-3-metilimidazolio) (IoLiTec Ionic liquids Technologies).
- Líquido iónico [C₈MIM][EtSO₄] ≈ [OMIM][EtSO₄] (etilsulfato de 1-octil-3-metilimidazolio) (IoLiTec Ionic liquids Technologies).
- Líquido iónico [BMIM][MeSO₄] (metilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio) (Sigma-Aldrich).
- Líquido iónico [BMIM][Cl] (cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio). (Sigma-Aldrich).
- Fosfato dipotásico (K₂HPO₄) (Scharlab, Barcelona, España).
- Ácido clorhídrico (HCl), (Sigma-Aldrich).
- Solución tampón de potasio dihidrogenofosfato/disodio hidrogenofosfato) pH 7 (Scharlab).

Recuperación de LI y purificación de ficocianina

En el proceso de recuperación del líquido iónico mediante diálisis, así como en el proceso de purificación de ficocianina mediante precipitación con sulfato de amonio se utilizan los siguientes materiales:

- Membrana de diálisis de celulosa con un peso molecular límite de 14 kDa (Sigma-Aldrich).
- Etanol (Scharlab).
- Sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ (Scharlab).

Electroforesis

Electroforesis desnaturalizante

- Geles de poliacrilamida Mini-Protean TGX (Precast Gels) 4-20% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE.UU.).
- Marcadores de peso molecular BlueStar Plus Prestained Protein Marker (DDBiolab, Barcelona, España).
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich).
- Glicerol (Sigma Aldrich).
- β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).
- Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich).
- Disolución tampón Laemmli (Bio-Rad Laboratories).
- Coomassie coloidal (G-250) (Bio-Rad Laboratories).
- Metanol (Scharlab).

- Ácido fosfórico (Sigma-Aldrich).
- Sulfato amónico (Sigma-Aldrich).

Electroforesis nativa

- Gel de poliacrilamida NativePAGE Novex 3-12% Bis-Tris (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).
- Marcadores de peso molecular NativeMark Unstained protein standard (Invitrogen).
- NativePAGE Sample Buffer (Invitrogen).
- Native PAGE Running Buffer (Invitrogen).
- NativePAGE Cathode Buffer (Invitrogen).
- Coomassie coloidal (G-250) (Bio-Rad Laboratories).
- Metanol (Scharlab).
- Ácido fosfórico (Sigma-Aldrich).
- Sulfato amónico (Sigma-Aldrich).

❖ Instalación experimental

Separación de ficocianina mediante sistema de dos fases acuosas (ATPS)

Para la construcción de las curvas binodales o curvas de equilibrio para cada líquido iónico es necesario disponer de un tubo de ensayo, donde inicialmente, se irá adicionando la disolución de sal sobre la disolución de líquido iónico para obtener el sistema bifásico; y donde después se adicionará agua para volver el sistema monofásico. La mezcla ha de estar en continua agitación, en un baño con temperatura controlada, por lo que es necesario un imán y una placa agitadora con controlador de temperatura.

La experimentación para la separación de la ficocianina de un extracto rico en ella y en otras proteínas, mediante un sistema ATPS se llevó a cabo en unos tubos de centrifuga graduados (figura 42), para poder medir así el volumen de la fase superior e inferior, necesario para el balance de materia de la ficocianina.

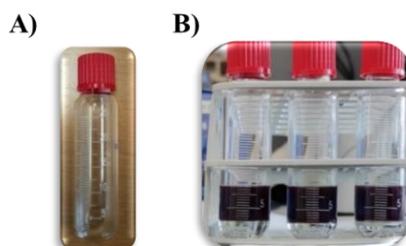


Figura 42. Tubo graduado para la separación de la ficocianina mediante un sistema ATPS (A) y ejemplo de separación de ficocianina del extracto crudo mediante el sistema ATPS (B).

Recuperación de LI y purificación de ficocianina

- **Diálisis:** El proceso de diálisis se desarrolló en una membrana de celulosa con un peso molecular límite de 14 kDa, introduciendo en el interior de dicha membrana el extracto rico en ficocianina del que se desea recuperar el LI. Tal y como se muestra en la figura 43, la membrana con el extracto rico en PC se introduce en un vaso de precipitados con agua para que tenga lugar la diálisis. Conforme pasa el tiempo el líquido iónico permea a través de la membrana hacia el exterior. Por ese motivo se aprecia un tono amarillento en el líquido externo y, alcanzado el equilibrio, se puede dar por finalizado el ciclo de diálisis.

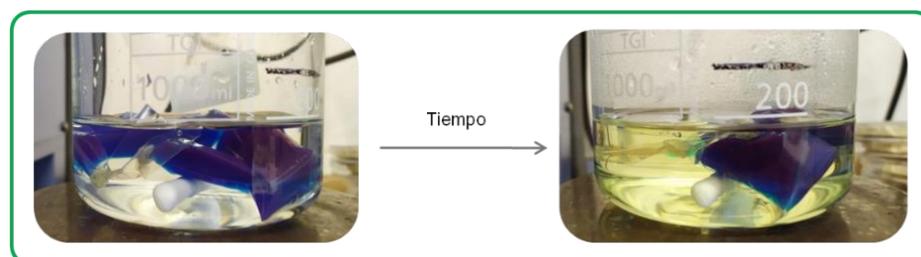


Figura 43. Instalación de diálisis para la recuperación del LI y la purificación de la ficocianina.

- **Precipitación de ficocianina:** para este procedimiento se emplean de nuevo los tubos de centrífuga mostrados anteriormente en la figura 40. También se necesita un imán, una placa calefactora y agitadora y un vortex.

❖ **Procedimiento experimental**

La separación y purificación de ficocianina, en la presente tesis doctoral, se lleva a cabo mediante dos enfoques a partir del extracto crudo de ficocianina: (1) diálisis + precipitación con sulfato de amonio y (2) sistema de dos fases acuosas (ATPS) + diálisis + precipitación con sulfato de amonio. Ambos esquemas de purificación de PC están dentro de un marco de biorrefinería (figura 44).

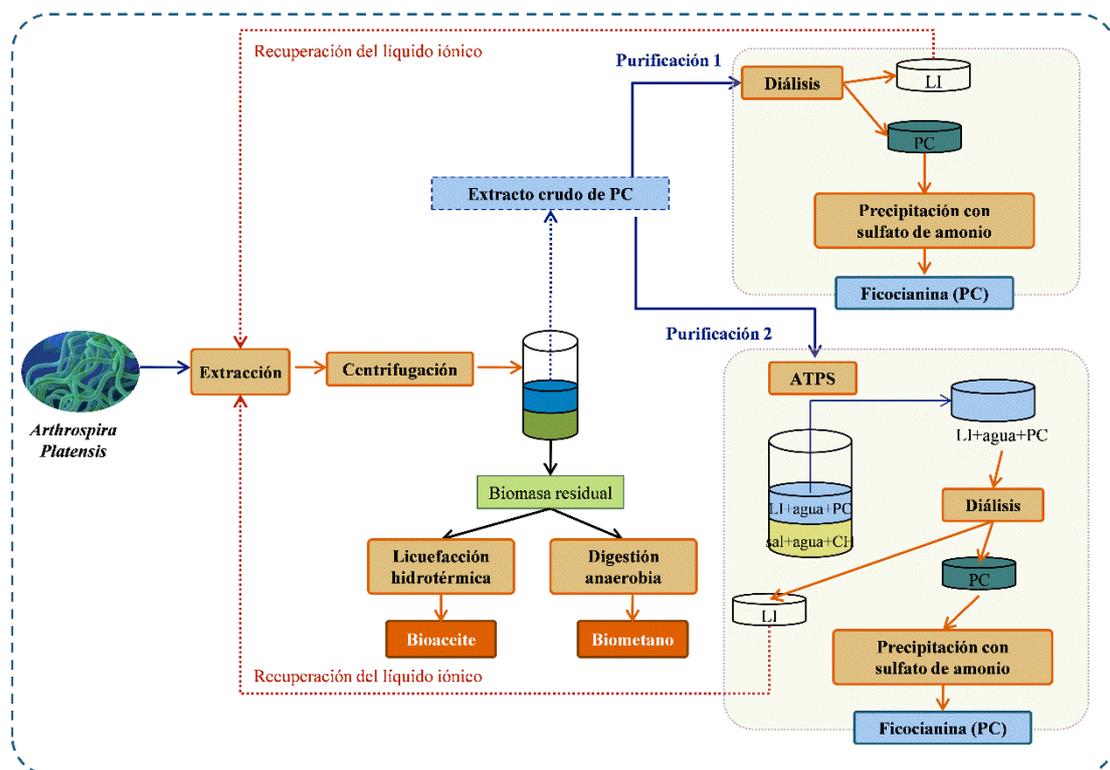


Figura 44. Esquemas de biorrefinerías propuestos junto con los dos enfoques de purificación de PC.

A continuación, se explica con más detalle la metodología de cada una de las etapas que conforman los dos enfoques de purificación.

Diálisis y recuperación del líquido iónico

En primer lugar, para llevar a cabo el proceso de diálisis, mediante el cual se recupera el líquido iónico y se separa de la ficocianina; se ha de acondicionar la membrana de diálisis.

- Acondicionamiento de la membrana de diálisis

Para poder acondicionar la membrana, en primer lugar, ésta se ha de introducir en un baño de agua destilada a 40°C durante una hora en agitación continua. A continuación, la membrana se introduce en un baño que contiene una mezcla de etanol y agua (50% v/v) a 40°C y en agitación continua. Por último, la membrana se sumerge durante toda la noche en agua desionizada en continua agitación para retirar el etanol residual.

- Diálisis

La recuperación del LI se realiza aplicando tres ciclos consecutivos de diálisis, de 4 horas de duración cada uno, de acuerdo con la siguiente secuencia. En primer lugar, el extracto crudo de PC, que contiene LI, agua y otras ficobiliproteínas, se introduce en el interior de la membrana, se cierran sus extremos y se sumerge en un baño de agua desionizada, con una relación volumétrica de extracto crudo de PC: agua exterior de 1:4; durante 4 h y en continua agitación.

Esto permite que el LI, [EMIM][EtSO₄], permee a través de la membrana ya que posee un peso molecular (236,29 Da) menor que el valor límite de aquella (14 kDa) y la PC, cuyo peso molecular es de ~30 kDa, quede retenida dentro de la membrana. A continuación, la membrana con el extracto de PC se colocó de nuevo en un baño de agua desionizada fresca, repitiendo la operación tres veces más. Se recogieron las fases acuosas externas, que contenían LI, y se eliminó parcialmente el agua. El contenido de agua restante se midió por valoración de Karl Fischer, y también se analizó por reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en un espectrómetro FTIR ATI Mattson Infinity Series (Mattson Instruments. Madison, WI, EE.UU.) con el objetivo de comprobar el estado del LI recuperado y evaluar su posible reutilización.

Precipitación de ficocianina con sulfato de amonio

Al proceso de diálisis le sigue una etapa de precipitación selectiva con sulfato de amonio, que presenta muchas ventajas frente a otros precipitantes, ya que evita la desnaturalización de las proteínas por su bajo calor de solubilización y su efecto bacteriostático [392,393]. La purificación de ficocianina por precipitación se realizó a temperatura controlada (25°C) en dos etapas de adición de sulfato amónico. En la primera etapa se añadió el agente precipitante hasta alcanzar el 20% de saturación, manteniendo la agitación durante 1 hora. Pasado ese tiempo, se detiene la agitación y la solución se mantiene a 25°C, durante 16 horas. A continuación, se procede a centrifugar la mezcla de forma que se recupera el sobrenadante resultante, rico en PC, y se elimina el precipitado de proteínas formado.

En una segunda etapa, se agrega al sobrenadante sulfato de amonio hasta un 50% de saturación, repitiendo de nuevo el proceso descrito en la primera etapa. En este caso, el precipitado resultante, rico en ficocianina, se disolvió en 10 mL de tampón fosfato (pH 7,0), midiendo la concentración de PC y su pureza mediante absorbancia UV-Vis (espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 1000. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Para comprender con más detalle el proceso se ha elaborado el esquema mostrado en la figura 45.

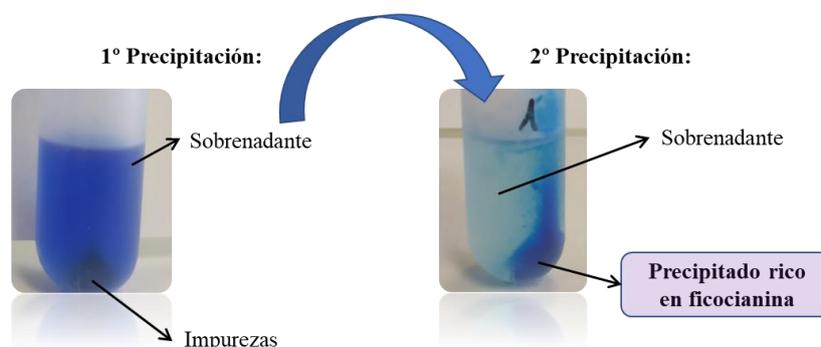


Figura 45. Etapas del proceso de precipitación de ficocianina con sulfato de amonio.

Asimismo, las fracciones obtenidas en el proceso se muestran en la figura 46, siendo el segundo precipitado el extracto de ficocianina purificado.

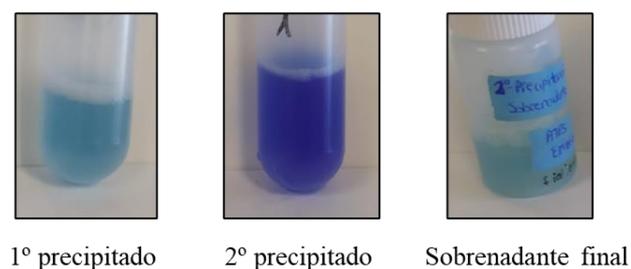


Figura 46. Fracciones obtenidas en ambas precipitaciones.

Sistemas de dos fases acuosas (ATPS)

Punto de niebla. Construcción de curvas binodales de equilibrio

Tal y como se mencionó en el apartado 1.2.8.2, para construir un sistema de dos fases acuosas hay que partir de la construcción de las curvas binodales o de equilibrio, necesarias para saber si el sistema es monofásico o bifásico (ATPS). En la presente tesis doctoral se construyeron seis curvas, una para cada LI estudiado: [EMIM][EtSO₄], [BMIM][EtSO₄], [HMIM][EtSO₄], [OMIM][EtSO₄], [BMIM][MeSO₄] y [BMIM][Cl]. El método que se siguió en la presente tesis doctoral fue el del punto de niebla o método del “*Cloud point*” (figura 47) ya que es el más adecuado cuando el sistema ATPS es del tipo LI/sal y se llevó a cabo bajo agitación continua y a 25°C.

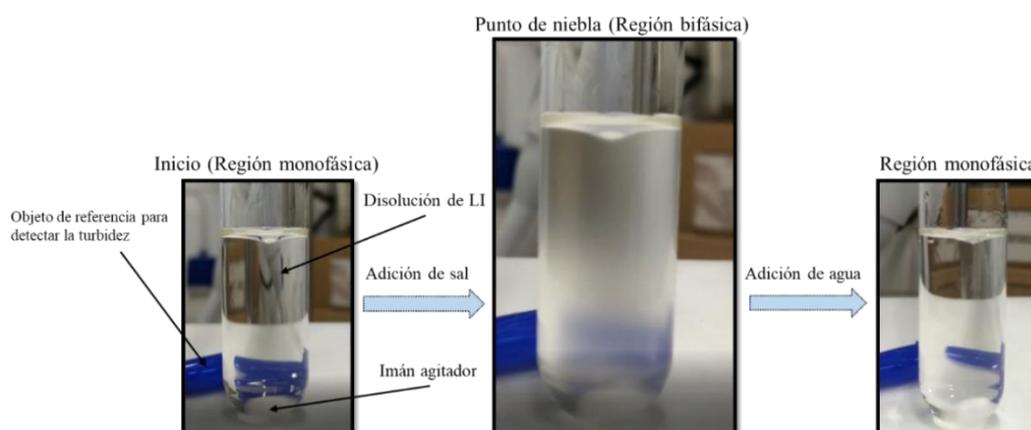


Figura 47. Método del punto de niebla.

Como se aprecia en la figura 47 el procedimiento experimental para la construcción de las curvas binodales se basa en la detección del punto de turbidez [232]. Para comenzar, se parte de una disolución acuosa de LI conocida (por ejemplo 60% p/p). La primera etapa consiste en adicionar gotas de una disolución acuosa de sal de concentración conocida (por ejemplo 50% p/p) hasta que se detecta visualmente una disolución turbia, es decir, cuando se alcanza el equilibrio o

el régimen bifásico. Una vez que esto sucede se anotará el peso de la disolución de sal añadida.

La segunda etapa tiene como objetivo alcanzar el régimen monofásico, para ello, se adiciona, gota a gota, agua desionizada hasta la formación de una disolución clara y transparente. Esto quiere decir que se ha roto el equilibrio y se ha alcanzado el régimen monofásico. Una vez que se tiene este régimen se anotará el peso de agua añadida. Esto se repetirá sucesivamente y de esta manera se pueden obtener todos los puntos de equilibrio necesarios para poder determinar la curva binodal.

Una vez que se ha construido la curva experimental de equilibrio, ésta se ha de ajustar a la ecuación de Merchuk (ecuación 3) [240]:

$$Y = A \cdot \exp[(B \cdot X^{0,5}) - (C \cdot X^3)] \text{ Ecuación 3}$$

Donde X e Y representan los porcentajes máxicos de sal y LI, respectivamente, y las constantes A, B y C son los parámetros de regresión de los datos de la curva binodal experimental. Tanto el tratamiento de los valores experimentales como el ajuste a la ecuación de Merchuk se realizaron con el programa *OriginPro 8.5*.

Determinación de las rectas de reparto

Una vez que se ha realizado el ajuste de los datos experimentales de la curva de equilibrio a la ecuación de Merchuk, se calcularon las rectas de reparto o *tie-lines* (TLs).

Las rectas de reparto se determinaron mediante un método gravimétrico propuesto originalmente por Merchuk y colaboradores [240]. En primer lugar, se elige al azar un punto de mezcla en la región bifásica y se prepara gravimétricamente. De esta forma, se formará un sistema ATPS con las cantidades correspondientes de líquido iónico, sal y agua del punto elegido. La mezcla bifásica se agita en vortex durante 30 s y se deja en reposo, al menos, media hora en un baño a 25°C hasta alcanzar la separación y el equilibrio de las dos fases coexistentes (figura 48). Para el aislamiento de cada una de las dos fases, y su posterior pesada, se emplea una pipeta.

Una vez que se tienen todos estos datos, para la determinación correcta de las TLs se ha de resolver el siguiente sistema de ecuaciones (Ecuaciones 4 a 7) [240,244]:

$$Y_T = A \cdot \exp[(B \cdot X_T^{0,5}) - (C \cdot X_T^3)] \text{ Ecuación 4}$$

$$Y_B = A \cdot \exp[(B \cdot X_B^{0,5}) - (C \cdot X_B^3)] \text{ Ecuación 5}$$

$$Y_T = \frac{Y_M}{\alpha} - \frac{1-\alpha}{\alpha} \cdot Y_B \text{ Ecuación 6}$$

$$X_T = \frac{X_M}{\alpha} - \frac{1-\alpha}{\alpha} \cdot X_B \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde T, B y M designan la fase superior, la fase inferior y el punto de mezcla (escogido al azar), respectivamente. A, B y C son los parámetros de la ecuación de Merchuk conocidos una vez realizado el ajuste de los datos experimentales a dicha ecuación, X e Y representan el porcentaje másico de la sal y del líquido iónico, respectivamente; por último, el parámetro α se define como la relación entre el peso de la fase superior y el peso total del sistema ATPS [394]:

$$\alpha = \frac{m_{superior}}{m_{total\ ATPS}} \quad \text{Ecuación 8}$$

La solución de este sistema arroja los valores de concentración (% p/p) de LI y sal en las fases superior e inferior y, por lo tanto, se pueden representar en el diagrama de equilibrio (curva binodal) las TLs.

Una vez que se tiene dicha recta de reparto se pueden construir distintos sistemas ATPS a lo largo de ella, variando la relación de volúmenes entre la fase superior e inferior. Para que la ficocianina se pueda distribuir sin problema en la fase superior (debido a la afinidad que tiene por el LI), en la presente tesis doctoral se trabajará con una relación de volúmenes 1:1, es decir, el volumen de la fase superior será igual al de la fase inferior. Para ello, se ha de calcular el punto medio de las TLs de la siguiente forma:

$$X_M = \frac{X_T + X_B}{2} \quad \text{Ecuación 9}$$

$$Y_M = \frac{Y_T + Y_B}{2} \quad \text{Ecuación 10}$$

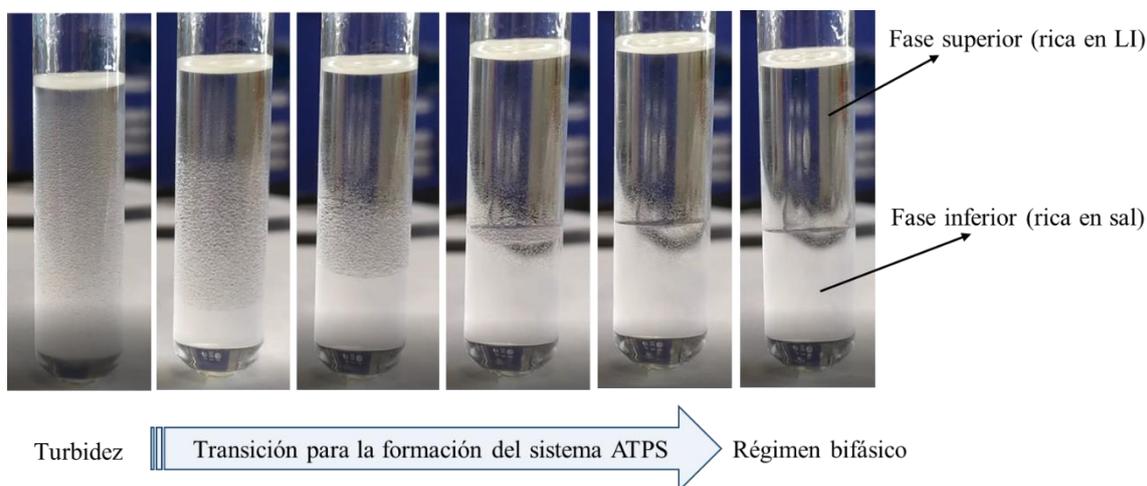


Figura 48. Formación del sistema ATPS.

Separación de ficocianina mediante ATPS

Como se ha mencionado anteriormente se elegirá el punto medio de la *tie-line* para construir el sistema ATPS, por lo que se tendrán volúmenes de la fase superior e inferior iguales. Esto se hará para cada uno de los sistemas ATPS que se quieren estudiar, es decir para cada uno de los LIs: [EMIM][EtSO₄], [BMIM][EtSO₄], [HMIM][EtSO₄], [OMIM][EtSO₄], [BMIM][MeSO₄] y [BMIM][Cl]. Antes de adicionar el extracto crudo de ficocianina al sistema ATPS, se ajustó el pH a 6,5-7 usando HCl, ya que la ficocianina es estable en un rango de pH de entre 6,0-7,0 y comienza a degradarse a pH superiores a 7 [395,396].

Una vez adicionado el extracto de ficocianina al sistema ATPS ambos se mezclaron en vortex durante 1 minuto. La mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos para facilitar la separación de ambas fases (figura 49). La fase inferior corresponde a la fase rica en sal, mientras que la fase superior corresponde a la fase rica en LI.

Las proteínas, incluida la PC, se concentran preferentemente en la fase superior, mientras que los carbohidratos se reparten en la fase inferior, preferentemente. Tal y como ya se describió en el *apartado 1.2.8.2* los aminoácidos cargados negativamente en la superficie de la proteína interactúan fuertemente con el catión del LI (cargado positivamente), promoviendo de esta manera la transferencia de proteínas a la fase rica en LI [251,397].

Ambas fracciones de volumen del ATPS son medidas y cada fracción fue analizada por absorción en espectrofotómetro UV-Vis (Nanodrop 1000. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).



Figura 49. Separación de ficocianina mediante los distintos sistemas ATPS.

Antes de añadir el extracto, del cual se quiere separar la ficocianina, se ha de tener en cuenta la cantidad de LI y agua que lleva el mismo para no desestabilizar el sistema ATPS, y, por ende, el equilibrio de éste al añadir el extracto. Por ese motivo, una vez establecido el punto medio de la *tie-line* con la que se quiere trabajar, el sistema ATPS se ha de construir con el defecto de agua y LI, igual a la cantidad que aporta de ambos el extracto. Sin embargo, también se necesitaría

un sistema ATPS completo, para ser usado como blanco en las medidas espectrofotométricas. Se decidió construir el sistema de ATPS con una masa total de 10 g, siendo el extracto añadido de 5 g.

Electroforesis

El análisis y caracterización de las proteínas mediante electroforesis se realizó en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), tanto para la técnica en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como en condiciones nativas, y los procedimientos fueron los siguientes:

SDS-PAGE

Se utilizó el gel Mini-Protean TGX 4-20% (BioRad Laboratories). En cada pocillo se aplicaron 20 μ L de muestra y en otro pocillo adicional se añadió la disolución con los marcadores de peso molecular. Las alícuotas de las muestras se hirvieron durante 5 minutos en la disolución tampón de carga (composición: 6 mM tampón Tris, 2% SDS, 10% Glicerol, 0,5 M β -mercaptoetanol y trazas de azul de bromofenol) y, a continuación, se enfriaron durante 5 minutos a 4°C. La electroforesis se lleva a cabo en el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) con disolución tampón Laemmli, manteniendo una diferencia de potencial constante de 100 V, hasta que el azul de bromofenol llega al final del gel.

Las proteínas se tiñeron con Coomassie coloidal (G-250). Para ello, previamente, el gel fue fijado en una disolución acuosa de metanol al 50% y ácido fosfórico al 2% durante 30 minutos. La solución de fijación se eliminó con dos lavados con agua desionizada, y el gel se equilibró en una disolución con metanol al 33%, sulfato amónico al 17% y ácido fosfórico al 3% durante 45 minutos. Tras esto, se añadió una disolución de Coomassie G-250 en metanol hasta alcanzar 6,6 mg/ml que se mantuvo durante toda la noche. Al día siguiente el exceso de Coomassie se eliminó lavando con agua desionizada.

Nativa

Se empleó el sistema electroforético NativePAGE (Thermo Fisher Scientific) utilizando el gel Novex 3-12% Bis-Tris. En los pocillos se aplicaron 10 μ L de muestra, y en otro adicional se añadió la disolución con los marcadores de peso molecular. Las alícuotas de la muestra se mezclaron con 2,5 μ L NativePAGE Sample Buffer. La electroforesis se desarrolla a 150 V en el sistema Mini Gel Tank y se mantiene hasta que el frente de electroforesis llega al final del gel, utilizando en el ánodo NativePAGE Running Buffer y en el cátodo NativePAGE Cathode Buffer. La tinción de las proteínas se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para la electroforesis SDS-PAGE anteriormente descrita.

3.1.3. Licuefacción hidrotérmica (HTL)

❖ Materiales

- Diclorometano (CH_2Cl_2) (Scharlab, Barcelona, España)
- Metanol (Scharlab).
- Etanol (Scharlab).
- Isopropanol (Scharlab).
- Disulfuro de carbono (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

❖ Instalaciones experimentales

Como se ha mencionado anteriormente, esta parte de la experimentación se ha llevado a cabo en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Química y Ambiental en el Centro de Apoyo Tecnológico de la Universidad Rey Juan Carlos en reactores discontinuos de acero de 4,1 mL que son capaces de soportar presiones de hasta 350 bar a temperatura ambiente.

Para el calentamiento de estos mini-reactores se introdujeron en un baño de arena Techne IFB-51 (Cole-Parmer, Illinois, EE.UU.), equipado con control de temperatura y flujo de aire que permite el calentamiento homogéneo del baño de arena hasta 700°C (figura 50).

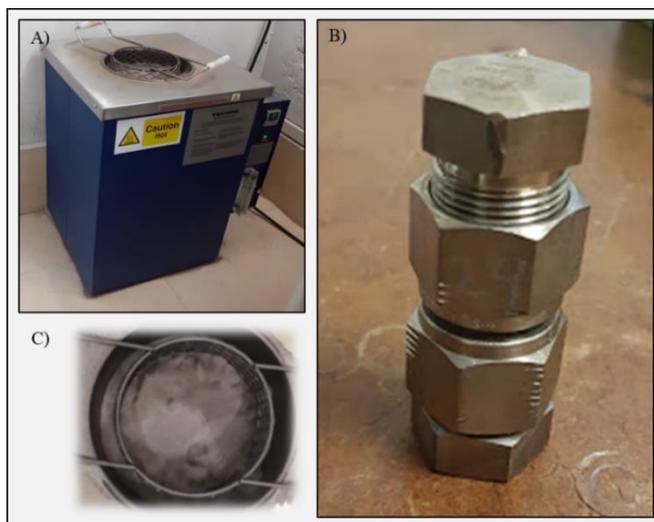


Figura 50. A) Baño de arena. B) Reactor de acero de 4,1 mL. C) Interior del baño de arena.

❖ Procedimiento experimental

Se estudió la producción de bioaceite a 300 y 350°C, a partir de biomasa residual (BMR) generada tras la extracción de ficocianina. Para ello, se utilizaron los reactores de acero inoxidable de 4,1 mL descritos en el apartado anterior. Se pesaron 0,3 g de biomasa residual (en base seca) y se añadieron 3 mL de agua, salvo en los casos en los que se utilizaron metanol, etanol e isopropanol como cosolventes, en los que se añadieron 1,5 mL de agua destilada y 1,5 mL del

alcohol correspondiente. Una vez que los reactores se cerraron y sellaron, se introdujeron en el baño de arena precalentado a 300°C o 350°C.

Pasado el tiempo de reacción (30 min) se sacaron los reactores del baño de arena y se enfriaron súbitamente en un baño de hielo. Una vez fríos, se abrieron y el líquido del interior se recolectó con la ayuda de diclorometano, se filtró para recuperar el residuo sólido y la mezcla restante se centrifugó para separar la fase orgánica (bioaceite) de la acuosa con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio. Una vez separadas, ambas fases se introdujeron en una estufa a 45°C para secarse, hasta alcanzar un peso constante.

3.1.4. Producción de biogás

❖ Materiales

- Los fangos anaerobios que se utilizan para la producción de biogás se recogieron en la EDAR de Móstoles El Soto.
- Kits de nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, test en cubetas DQO (SpectroQuant) y test en cubetas fosfatos (SpectroQuant, Merck. Darmstadt, Alemania).
- Glicerol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

❖ Instalaciones experimentales

La producción de biogás y, por ende, de biometano, se llevó a cabo en botellas de vidrio de 100 mL. Dichas botellas se cerraron y sellaron con cápsulas de aluminio con septum que permitía tomar muestra gaseosa siempre que fuera necesario. Estas botellas se introdujeron en una estufa bacteriológica y de cultivo modelo INCUBAT 150L (J. P. Selecta. Barcelona, España) que será la que establezca las condiciones a las que se lleva a cabo la digestión anaerobia (condiciones termofílicas o mesofílicas) (figura 51).

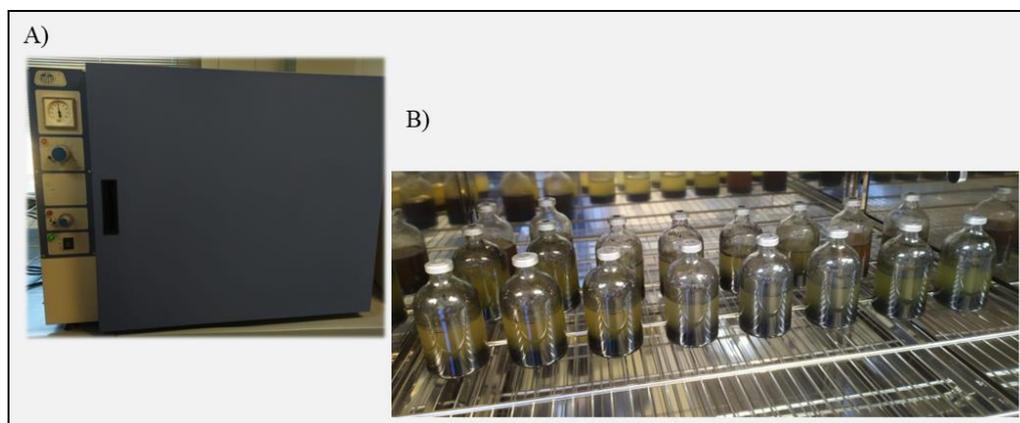


Figura 51. Instalación experimental para la producción de biogás. A) Estufa. B) Interior de la estufa, ensayos de biogás.

La muestra de gases recogida de los ensayos de biogás en las botellas se introduce en un cromatógrafo de gases GC 4000A con detector de conductividad térmica (TCD) (East & West Analytical Instruments, Beijing, China) (figura 52), previamente calibrado. El gas portador para este cromatógrafo es Helio, y la presión que se ha de tener de dicho gas es de 5 bar. El cromatógrafo está provisto de una columna Carboxen 1010 (30 m de longitud x 0,53 mm de diámetro).



Figura 52. Cromatógrafo de gases GC 4000A utilizado para el análisis del biogás (CO₂ y CH₄).

❖ Procedimiento experimental

De igual forma que el proceso de HTL, la digestión anaerobia se ha llevado a cabo con la BMR resultante de la extracción de ficocianina y para la biomasa inicial *Arthrospira platensis*. El ensayo se llevó a cabo en condiciones mesofílicas (37°C) y termofílicas (55°C).

El ensayo se realizó en las botellas de vidrio descritas en el apartado anterior. Se utilizó una relación de sustrato:inóculo de 1:2 (en masa de sólidos volátiles) ya que estudios previos demostraron que es la más adecuada [366]. Se añadió la cantidad de biomasa necesaria para cumplir con la relación 1:2 sustrato: inóculo; a continuación, se añadieron 44 mL de inóculo, con un contenido en sólidos volátiles (SV) del 1%, y se enrasó con agua desionizada hasta un volumen total de 67 mL. Cada ensayo se realizó por triplicado y también realizaron tres réplicas de un ensayo control sin sustrato. Para evaluar el efecto de un cosustrato, se adicionó glicerol, en concentración del 20% en SV. Teniendo en cuenta que las botellas de vidrio eran de 100 mL tras el llenado con el inóculo y el sustrato, queda un volumen libre, denominado volumen de cabeza (33 mL), donde se va a alojar el gas (biogás) producido por los microorganismos mediante la digestión anaerobia. Las botellas se cerraron con un septum de goma y se sellaron con cápsulas de aluminio, permitiendo aislar así los experimentos de agentes externos. Inicialmente se inertizaron las botellas con nitrógeno para evitar la presencia de oxígeno.

El procedimiento para evaluar la producción de metano es el siguiente:

En primer lugar, se ha de medir la presión con un sensor de presión modelo 400 (Vernier, Beaverton, EE.UU.), a su vez, conectado a un ordenador y mediante el programa Vernier Graphical Analysis. A continuación, se tomaron 500 μ L de muestra de biogás de las botellas de vidrio y se pincharon en un cromatógrafo de gases GC 4000 A con detector de ionización de llama (FID) y detector de conductividad térmica (TCD), previamente calibrado. Por último, se purgaron las botellas con nitrógeno hasta alcanzar la presión atmosférica tras cada toma de muestra.

3.2. Métodos de análisis

3.2.1. Caracterización de la microalga de partida y de la biomasa residual

❖ Materiales

- Ácido sulfúrico (Scharlab, Barcelona, España).
- Fenol (Scharlab).
- Cloroformo (Scharlab).
- Metanol (Scharlab).
- Hidróxido de sodio (Scharlab).
- Carbonato de sodio (Scharlab).
- Sal disódica EDTA (Scharlab).
- Sulfato de cobre (II) (Scharlab).
- Solución tampón de potasio di hidrogenofosfato/disodio hidrogenofosfato) pH 7 (Scharlab).
- Tritón 100X (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).
- Tartrato de sodio y potasio (Sigma Aldrich).
- Fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) (Sigma Aldrich).
- Reactivo Folin (Sigma Aldrich).
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Sigma Aldrich).

❖ Procedimiento experimental

Los lípidos se extrajeron y se cuantificaron de acuerdo a una versión adaptada del método de Bligh y Dyer usando una mezcla de cloroformo: metanol (2:1 (v:v)) [398,399] y se determinaron gravimétricamente.

Las proteínas se midieron por el método de Lowry [400], que se lleva a cabo bajo completa oscuridad. Para el caso de la cianobacteria *Arthrospira platensis* la pared celular es tan robusta y rígida que la disolución de lisis comúnmente utilizada no es capaz de romperla eficazmente. Por ello, se llevaron a cabo varios ciclos de congelación-descongelación en tampón fosfato (pH 7) y al sobrenadante resultante se le añadieron 100 μ L de SDS y 1 mL del reactivo de

Lowry. Al cabo de 5 min se añadió el reactivo de Folin y se esperó durante 30 min. Finalmente, se midió la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro a 750 nm. Las proteínas totales se calcularon gracias a una curva patrón, previamente elaborada, con seroalbúmina bovina (BSA).

Los carbohidratos se determinaron mediante el método de DuBois o método del fenol-sulfúrico, usando d-glucosa como estándar [401]. Se agregó 1 mL de fenol (5%) a 0,3 mL de disolución de lisis, a continuación, se añadieron, 5 mL de ácido sulfúrico (98%). Agitar la muestra y dejar en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 485 nm.

Los carbohidratos solubles se determinaron usando el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DSN) descrito en bibliografía [402,403].

Las cenizas se determinaron por gravimetría, eliminando la materia orgánica de la cianobacteria o de la biomasa residual mediante calcinación a 750°C, durante 5 h, con una rampa de 50°C por minuto.

3.2.2. Determinación de ficobiliproteínas

La cantidad extraída de cada ficobiliproteína se determinó suspendiendo 0,1 g de *A. platensis* seca en tampón fosfato 0,1 M (pH 7). La mezcla se agitó durante 30 segundos en vortex. A continuación, la suspensión se congeló con nitrógeno líquido y se descongeló a 4°C con agitación. Este procedimiento se repitió hasta 5 veces para asegurar que las paredes celulares se fragmentaran y todas las ficobiliproteínas fuesen extraídas.

Las cantidades extraídas de ficocianina (PC), aloficocianina (APC) y ficoeritrina (PE) (E_{PC} , E_{APC} , E_{PE}) se midieron mediante absorción en un espectrofotómetro UV-Vis-NIR Varían Cary 500 (Varian. Palo Alto, CA, EE.UU.) usando las siguientes ecuaciones adaptadas de estudios previos [404]:

$$E_{PC} \left(\frac{mg \text{ PC}}{g \text{ biomasa}} \right) = \left(\frac{OD_{615} - 0.474 \cdot OD_{652}}{5.34} \right) \cdot \frac{V_{muestra}(ml)}{m_{biomasa}(g)} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$E_{APC} \left(\frac{mg \text{ APC}}{g \text{ biomasa}} \right) = \left(\frac{OD_{652} - 0.208 \cdot OD_{615}}{5.09} \right) \cdot \frac{V_{muestra}(ml)}{m_{Biomasa}(g)} \quad \text{Ecuación 12}$$

$$E_{PE} \left(\frac{mg \text{ PE}}{g \text{ biomasa}} \right) = \left(\frac{OD_{562} - 2.41 \cdot PC - 0.849 \cdot APC}{9.62} \right) \cdot \frac{V_{muestra}(ml)}{m_{Biomasa}(g)} \quad \text{Ecuación 13}$$

La pureza de cada ficobiliproteína (P_{PC} , P_{APC} , P_{PE}) fue calculada como una fracción del contenido de proteína total utilizando las siguientes ecuaciones [405]:

$$P_{PC} = \frac{OD_{615}}{OD_{280}} \quad \text{Ecuación 14}$$

$$P_{APC} = \frac{OD_{652}}{OD_{280}} \quad \text{Ecuación 15}$$

$$P_{PE} = \frac{OD_{562}}{OD_{280}} \quad \text{Ecuación 16}$$

Dónde OD_{615} , OD_{652} , OD_{562} y OD_{280} son los valores de densidad óptica medidos a 615, 652, 562 y 280 nm, respectivamente.

3.2.3. Separación y Purificación de ficocianina

Como se ha visto previamente, mediante el sistema ATPS se separó la ficocianina, la cual se concentró preferentemente en la fase superior. Aun así, para poder realizar el correspondiente balance de materia de dicha ficobiliproteína fue necesario calcular la recuperación de esta en ambas fases. Para ello se miden ambos volúmenes y cada fracción se analizó por absorción espectrofotométrica (UV-Vis-Nanodrop 1000. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). La concentración de PC fue calculada usando la ecuación 17, derivada de la ecuación 11:

$$C_{PC} \left(\frac{mg \text{ PC}}{mL} \right) = \left(\frac{OD_{615} - 0.474 \cdot OD_{652}}{5.34} \right) \quad \text{Ecuación 17}$$

Mientras que las recuperaciones de PC en la fase superior e inferior del sistema ATPS fueron calculadas mediante las siguientes ecuaciones:

$$R_{Superior}(\%) = \frac{PC_{Superior}(mg)}{PC_{inicial}(mg)} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 18}$$

$$R_{Inferior}(\%) = \frac{PC_{Inferior}(mg)}{PC_{inicial}(mg)} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde $PC_{Superior}$ y $PC_{Inferior}$ representan la cantidad de ficocianina en la fase superior e inferior, respectivamente; y $PC_{inicial}$ la cantidad de ficocianina (mg) en el extracto crudo.

En la presente tesis doctoral se presta especial atención a la pureza de la ficocianina. Por ese motivo se desarrollaron los dos esquemas de purificación mostrados en el apartado 3.1.2 y, en la figura 44. Con el fin de poder evaluar cada etapa de purificación y comparar ambos esquemas entre sí (purificación 1 vs. purificación 2) se recurrió también a definir un factor de purificación (PF), el cual es una relación entre la pureza de PC en cada fracción purificada con respecto al extracto crudo inicial.

$$PF = \frac{P_{PC}(final)}{P_{PC}(extracto \text{ inicial})} \quad \text{Ecuación 20}$$

En el esquema de purificación 2 la fase superior (rica en ficocianina) se dializó y luego

se trató con sulfato de amonio para precipitar y purificar las proteínas presentes en el extracto de PC, siguiendo los métodos descritos en el *apartado 3.1.2*. De igual forma, la pureza y el factor de purificación para cada extracto de PC purificada se determinaron de acuerdo con las ecuaciones 14 y 20.

3.2.4. Análisis de los productos del proceso de HTL

Los distintos rendimientos de las fracciones que se obtienen en el proceso de licuefacción hidrotérmica (bioaceite, fase acuosa y residuo sólido) se determinan en base seca a partir de las ecuaciones 21-23:

$$Y_B(\%) = \frac{\text{masa del biocrudo}}{\text{masa seca de la microalga}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 21}$$

$$Y_{FA}(\%) = \frac{\text{masa de sólidos orgánicos solubles}}{\text{masa seca de la microalga}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 22}$$

$$Y_{RS}(\%) = \frac{\text{masa del residuo sólido}}{\text{masa seca de la microalga}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 23}$$

El rendimiento de fase gaseosa fue calculado por diferencia.

El bioaceite y la microalga se analizaron mediante análisis elemental con un equipo Flash 2.000 (Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA, EE.UU.) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). El contenido de C, H, N y S se determinó mediante un reactor de oxidación/reducción a 900°C; mientras que el contenido de O se determinó independientemente a partir de un reactor de pirólisis específico a 1060°C. A partir del análisis elemental, se calculó el HHV del bioaceite y de la biomasa de las microalgas por medio de la fórmula empírica de Boie [406]:

$$HHV \left(\frac{MJ}{Kg} \right) = 0,3516 \cdot C + 1,16225 \cdot H - 0,11090 + 0,0628 \cdot N \quad \text{Ecuación 24}$$

Y, por último, la energía recuperada (ER) se calculó a partir de la ecuación 25:

$$ER (\%) = \frac{(\text{HHV del bio - aceite} \cdot \text{masa bio - aceite})}{(\text{HHV microalga} \cdot \text{masa seco de la microalga})} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 25}$$

La calidad del bioaceite también fue analizada mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) en un equipo Bruker 320 GC-MS (Bruker, Billerica, Massachusetts, EE.UU.) con una columna xi-5Sil- MS (30 metros, 0.25 mm ID, 0.25 µm df.).

3.2.5. Análisis de la producción de biogás

En primer lugar, se determinan los sólidos totales y los sólidos volátiles (SV) tanto de la biomasa que se va a digerir (sustrato) o cosustrato (en el caso de que se utilice) como del lodo

activo (inóculo) para poder así establecer la relación sustrato:inóculo 1:2. Para la medida de los sólidos totales, se toma una muestra de 1 g y se seca en una mufla/estufa a 110°C durante toda la noche, hasta alcanzar peso constante. A continuación, la muestra seca se calcina a 550°C durante 2 horas con una rampa de calentamiento de 50°C/min, para determinar los SV.

3.2.5.1. Determinación del potencial bioquímico de metano

Para la determinación del potencial bioquímico de metano (BMP) se tienen en cuenta, tanto la recta de calibrado correspondiente como las siguientes ecuaciones [407].

$$BMP = \frac{V_{TCH_4}CE}{gSV} \quad \text{Ecuación 26}$$

$$V_{TCH_4}CE = V_{CH_4}CE + V_{CH_4disuelto}CE \quad \text{Ecuación 27}$$

$$V_{CH_4}CE = \frac{n_{CH_4} \cdot R \cdot T_{CE}}{P_{CE}} \quad \text{Ecuación 28}$$

$$n_{CH_4} = (A_{CH_4} \cdot m - n) \cdot \frac{V_C}{V_p} \quad \text{Ecuación 29}$$

$$V_{CH_4disuelto}CE = \frac{n_{CH_4disuelto} \cdot R \cdot T_E}{\Delta P} \quad \text{Ecuación 30}$$

$$n_{CH_4disuelto} = M_{CH_4disuelto} \cdot V_U \quad \text{Ecuación 31}$$

$$M_{CH_4disuelto} = \frac{M_{H_2O} \cdot X_{CH_4disuelto}}{1 - X_{CH_4disuelto}} \quad \text{Ecuación 32}$$

$$X_{CH_4disuelto} = \frac{\Delta P}{H_{CH_4}} \quad \text{Ecuación 33}$$

$$H_{CH_4} = 10^{\left(\frac{-673,74}{T_E} + 6,88\right)} \quad \text{Ecuación 34}$$

Donde:

- BMP: Potencial bioquímico de metano (L/gSV).
- $V_{TCH_4}CE$: Volumen total de CH₄ en condiciones estándar (L).
- gSV: sólidos volátiles iniciales del sustrato.
- $V_{CH_4}CE$: Volumen de CH₄ en condiciones estándar (L).
- $V_{CH_4disuelto}CE$: Volumen de CH₄ disuelto (L).
- n_{CH_4} : Moles de CH₄ (mol) calculados a partir de la recta de calibrado y el área (A_{CH_4}).
- R=Constante de los gases ideales (atm·L/K·mol).

- T_{CE} : Temperatura en a condiciones estándar (273K).
- P_{CE} : Presión a condiciones estándar (1 atm).
- A_{CH_4} : Área del pico de metano.
- m : Pendiente de la recta de calibrado.
- n : Ordenada en el origen de la recta de calibrado.
- V_C : Volumen de cabeza (volumen libre de la botella).
- V_p : Volumen pinchado (500 μ L).
- $n_{CH_4\text{disuelto}}$: Moles de CH₄ disueltos (mol).
- T_E : Temperatura del experimento (K).
- ΔP : Incremento de la presión del ensayo (atm).
- $M_{CH_4\text{disuelto}}$: Concentración molar del CH₄ disuelto (mol/L).
- V_U : Volumen útil de la botella (L).
- M_{H_2O} : Concentración molar del agua (mol/L).
- $X_{CH_4\text{disuelto}}$: Fracción molar del CH₄ disuelto.
- H_{CH_4} : Constante de Henry para el CH₄ (atm).

3.2.5.2. Análisis iniciales y finales

Se realizaron análisis de demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno total, amonio y fosfatos a partir de los protocolos proporcionados por la casa comercial que proporcionó los kits adecuados para los análisis. Es necesario realizar estos análisis en las muestras iniciales de la mezcla del sustrato con el inóculo y también realizarlos para las muestras finales del residuo.

En ambos casos, la mezcla se centrifugó y se filtró. Con el sobrenadante resultante se hicieron los análisis mencionados. Previamente se hicieron los calibrados correspondientes.

Demanda química de Oxígeno (DQO)

En el Kit proporcionado vienen preparadas unas cubetas tal y como se muestran en la figura 53:

En primer lugar, se ha de agitar por balanceo la cubeta de reacción proporcionada. A continuación, se echan 3 mL de la muestra ya centrifugada y filtrada (sobrenadante) y se mezcla vigorosamente. Dicha mezcla se calienta durante 120 minutos a 148°C, tal y como se muestra en la imagen (figura 53). Una vez transcurrido el tiempo establecido, la mezcla se enfría a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agita por balanceo y se mantiene la cubeta en reposo durante 30 minutos. Por último, se mide por absorbancia en el espectrofotómetro a 585 nm.



Figura 53. Análisis de DQO.

Nitrógeno total

De igual forma que para la DQO, se echa 1 mL de muestra centrifugada y filtrada junto con 9 mL de agua destilada y se mezcla vigorosamente. A continuación, se añade 1 microcuchara del reactivo N-1K y, de nuevo, se mezcla. Seguidamente, se añaden 6 gotas del reactivo N-2K, se cierra firmemente el tubo y se mezcla.

La mezcla se calienta durante 1 hora a 120°C. Y, pasado ese tiempo, se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Una vez enfriada la muestra digerida se trasvasa 1 mL de ésta a una cubeta de reacción llena, importante no mezclar todavía. Posteriormente, se añade 1 mL del reactivo N-3K, se cierra firmemente la cubeta y se mezcla.

Por último, se deja en reposo la cubeta durante 10 minutos y se mide en el espectrofotómetro a 345 nm.

Fosfatos

Se prepara un tubo vacío y se añade 0,5 mL de muestra filtrada y centrifugada. A continuación, se añaden 0,5 mL de reactivo PO₄-1 y se mezcla. Seguidamente, se añade una dosis del reactivo PO₄-2 y se agita vigorosamente. Por último, se deja en reposo durante 5 minutos y se mide en el espectrofotómetro a 420 nm.

Amonio

Se prepara un tubo vacío para llevar a cabo el análisis, se adicionan 5 mL del reactivo NH₄-1. A continuación, se añaden 0,1 mL de muestra y 1 microcuchara rasa del reactivo NH₄-2, y se agita la mezcla vigorosamente. Por último, se deja en reposo durante 15 minutos y se mide en el espectrofotómetro a 690 nm.

3.3. Biorrefinerías propuestas. Contexto de la tesis doctoral

En el caso particular de la presente tesis, se plantearon dos esquemas de biorrefinería con el fin de evaluar las diferentes posibilidades de integración energética del proceso de extracción y purificación de PC junto con el aprovechamiento de la biomasa resultante de dicho proceso. Las dos biorrefinerías propuestas recogen dos opciones de revalorización energética de la biomasa residual: licuefacción hidrotérmica y digestión anaerobia, tal y como se muestra en la figura 54. Ambas biorrefinerías propuestas parten de la misma biomasa residual y revalorizan esta última mediante diferentes procesos termoquímicos y/o bioquímicos.

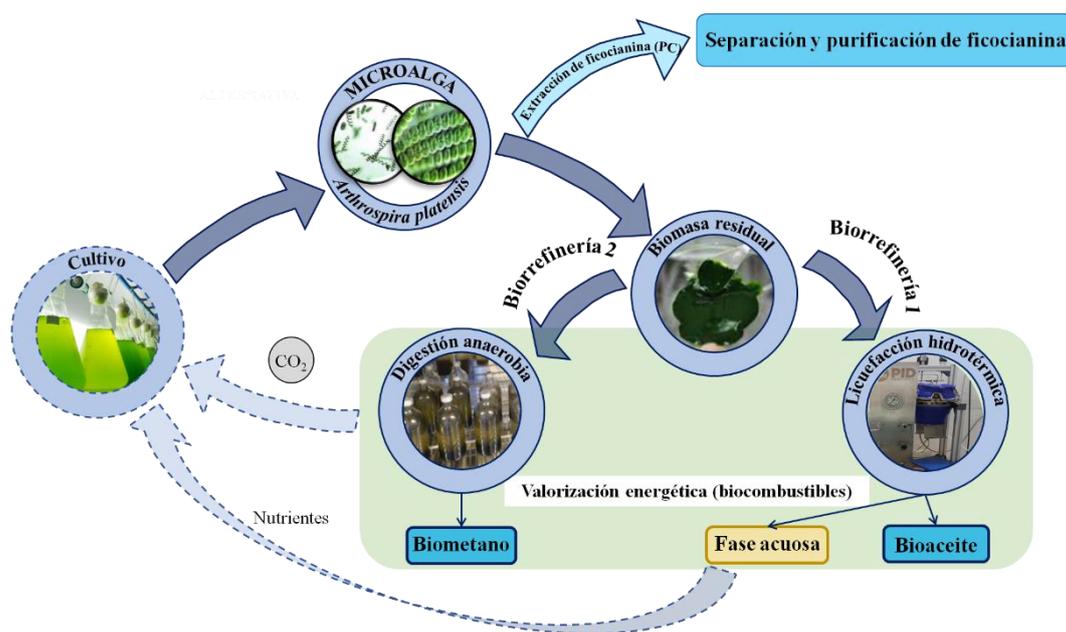


Figura 54. Esquema de las biorrefinerías propuestas en la presente tesis doctoral.

En la primera biorrefinería propuesta se estudia la utilización de la biomasa residual húmeda, resultante del proceso de extracción de ficocianina mediante LI, de la microalga *Arthrospira platensis* en la producción de bioaceites a partir del proceso de HTL. Gracias a este bioaceite se produce la valorización energética de dicha biomasa residual y, con respecto a la fracción acuosa, ésta podría recircularse a la etapa de cultivo. Otra opción planteada es la biorrefinería 2, que estudia el aprovechamiento de esa biomasa residual para producir biometano mediante la digestión anaerobia. El dióxido de carbono generado gracias a este proceso bioquímico podría recircularse también a la etapa de cultivo.

Hoy en día, planificar y diseñar un proceso más viable es uno de los retos fundamentales en el desarrollo de producciones más verdes. Por otro lado, que un proceso sea viable sólo puede alcanzarse con una combinación de principios económicos, técnicos y ambientales, a través de una perspectiva de simulación. Esta idea puede ser aplicada a las biorrefinerías ya que proporciona combustibles y productos químicos medioambientalmente viables y parece ser la alternativa más

favorable para continuar con el desarrollo sostenible [408]. A partir de los datos que se generan en la simulación, y, para poder llevar a cabo el diseño y planificación previa de un proceso; se han utilizado herramientas como el Análisis del ciclo de vida (ACV). De esta forma se puede determinar el impacto ambiental que producen los procesos estudiados.

3.4. Simulación y optimización

La simulación de un sistema basado en modelos matemáticos y datos sin procesar suele ser algo complejo y que requiere mucho tiempo. Las herramientas de software pueden reducir significativamente la complejidad del modelado y simulación de una planta prospectiva debido a sus bases de datos únicas y cálculos organizados [408]. Gran cantidad de herramientas de software como Aspen plus [409], SuperPro Designer [410], BioSTEAM [411], IPSEpro [412], WinGEMS, etc. son utilizadas como programas tecnológicamente avanzados para modelar gran cantidad de biorrefinerías virtuales.

En esta etapa se han simulado todos los procesos planteados en ambas biorrefinerías (cultivo, extracción de ficocianina con líquido iónico, purificación mediante sistema de dos fases acuosas, diálisis y precipitación con sulfato de amonio, licuefacción hidrotérmica y digestión anaerobia) empleando el software comercial SuperPro Designer 9.5, seleccionando los modelos para cada uno de los equipos y empleando los datos experimentales optimizados en cada una de las etapas ya mencionadas (figura 55). El programa SuperPro Designer fue desarrollado por Intelligen, Inc en 1991, y es una herramienta muy valiosa para el desarrollo de ingeniería de procesos y fabricación, en el ámbito de biotecnología, y farmacéutica, entre otros. Las principales ventajas de SuperPro Designer son la gran base de datos de compuestos específicos, operaciones unitarias, procesos biológicos y la capacidad de evaluar los índices de rendimiento del proceso económico y ecológico. Esta herramienta es apropiada para planificadores e investigadores en el diseño de procesos de biorrefinería, unidades de separación y análisis tecnoeconómicos.

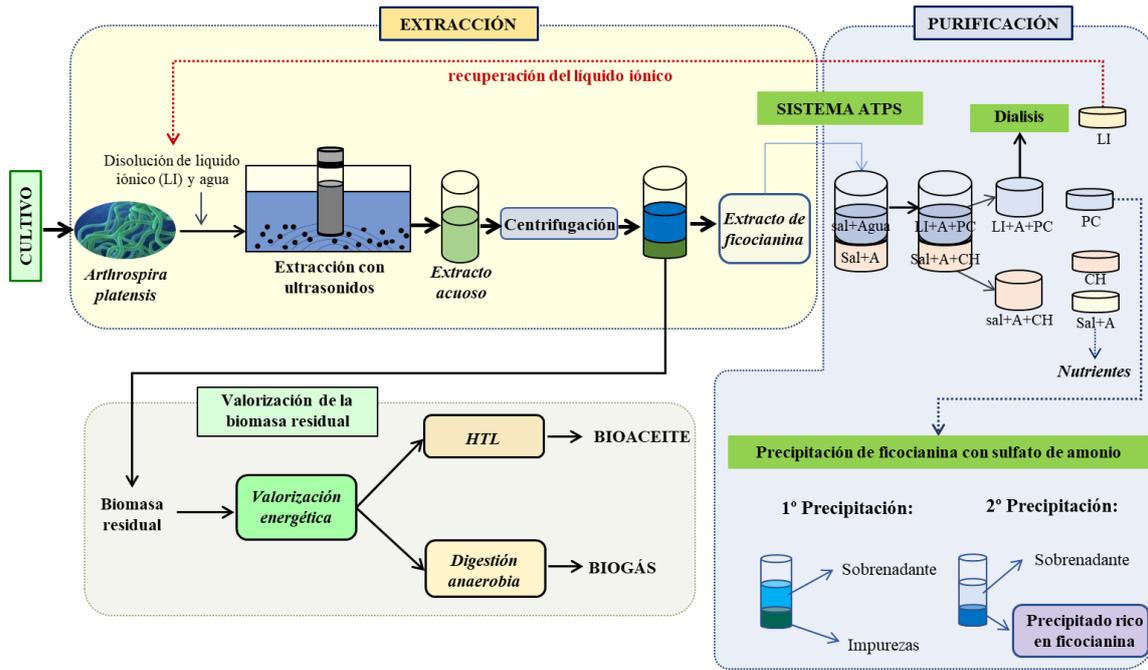


Figura 55. Esquema detallado de los procesos que se incluyen en la simulación. Elaboración propia.

Como ya se ha mencionado, el proceso mostrado en la figura 55, fue simulado con el software SuperPro Designer 9.5 (ver esquemas en las figuras 56 y 57), a partir de los resultados experimentales y los resultados materiales y energéticos obtenidos por la simulación se construyeron los inventarios necesarios del sistema para la realización del ACV.

METODOLOGÍA

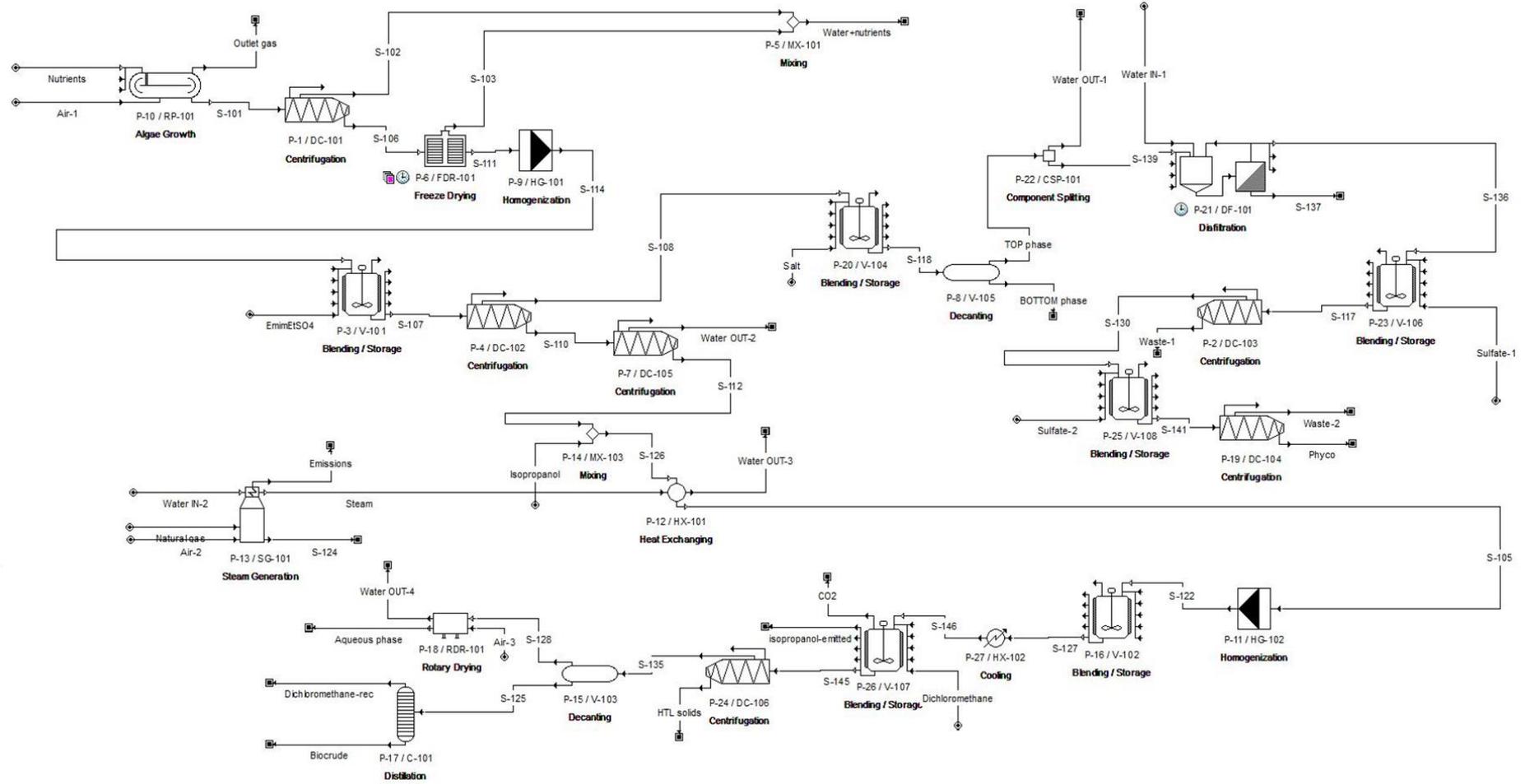


Figura 56. Diagrama de flujo para la simulación del proceso de biorrefinería 1 (revalorización de la biomasa residual mediante HTL).

METODOLOGÍA

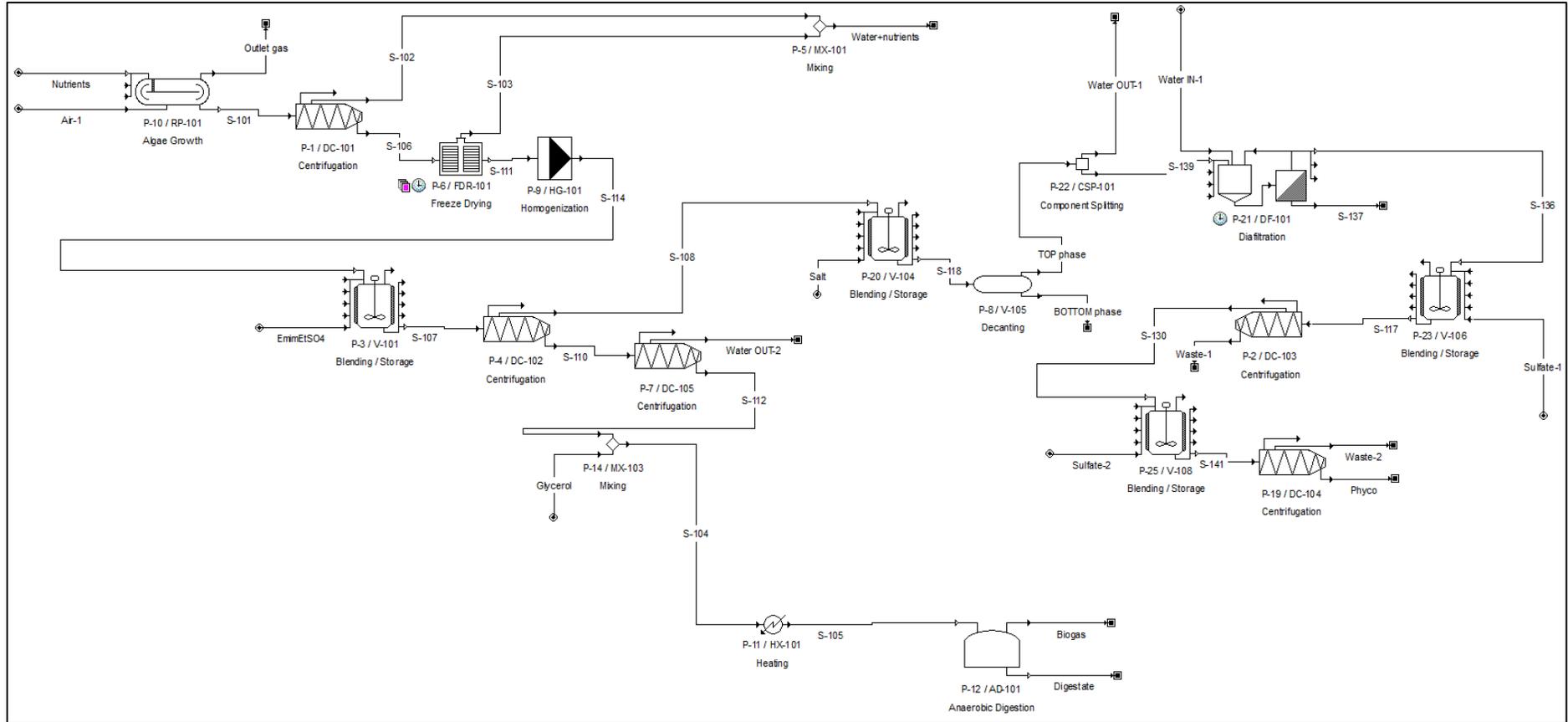


Figura 57. Diagrama de flujo para la simulación del proceso de biorrefinería 2 (revalorización de la biomasa residual mediante digestión anaerobia).

3.5. Análisis del ciclo de vida de los procesos (ACV)

Como ya se mencionó, el Análisis del Ciclo de Vida es una metodología de evaluación ecuánime de las cargas ambientales asociadas a un producto o proceso y para ello es necesario identificar y cuantificar el uso de recursos, energía y vertidos del sistema estudiado. El objetivo de esta herramienta es determinar el impacto que produce ese sistema en el medio ambiente, como un método de evaluación y de estrategia de mejora continua. Con lo que gracias a esta metodología se estudian los impactos potenciales de las biorrefinerías propuestas en la presente tesis doctoral a lo largo de todo su ciclo de vida, y esto, permite conocer las etapas críticas de ambas desde un punto de vista ambiental.

La metodología seguida para realizar el Análisis de Ciclo de Vida es sistemática y se puede dividir en cuatro fases [413]:

1. **Definición del objetivo y alcance del estudio:** en esta fase se define el objeto de estudio, las razones y el objetivo que se pretende alcanzar, por ello habrá que establecer:
 - a) Unidad funcional: es la referencia del ACV, sirve para la normalización de las entradas y salidas del sistema.
 - b) Límites del sistema: deberán estar bien establecidos y definidos, y se concretará qué elementos se van a tener en cuenta y cuáles no.
2. **Análisis de inventario:** en esta fase se incluye la recolección de datos que permitan establecer los recursos materiales y energía que van a ser empleados. De forma complementaria, se indican las corrientes de salida (emisiones, productos, residuos, etc.) y las de entrada (material y energía). Para ello, se lleva a cabo una búsqueda bibliográfica, así como una serie de cálculos para poder elaborar las tablas en las que se estructura el Inventario de Ciclo de Vida (ICV).
3. **Evaluación de impactos:** esta etapa consiste en evaluar tanto cualitativa como cuantitativamente los impactos ambientales asociados al proceso. Es la etapa en la que los datos del inventario se transforman en los impactos ambientales que provocan. En esta etapa se emplea el programa SimaPro 7.2 gracias al cual se puede modelar dicho sistema para obtener su ACV y calcula los impactos ambientales del proceso.
4. **Interpretación de resultados:** en esta fase se examinan tanto los resultados obtenidos del análisis de inventario, como los obtenidos en la etapa de evaluación con el objetivo de poder tomar decisiones que supongan una mejora del proceso estudiado. En la presente tesis, conociendo el nivel de alteración medioambiental provocado por cada escenario planteado y analizado, se puede indicar cual representa la alternativa más favorable desde un punto de vista medioambiental.

Se evaluó la viabilidad ambiental y energética de los procesos estudiados mediante ACV

de acuerdo con la norma internacional ISO 14040:2006 [413]. Por último, se interpretaron los resultados obtenidos para poder identificar aquellos equipos y operaciones responsables de los mayores impactos y poder proponer futuras modificaciones en el proceso.

❖ **Unidad funcional**

La unidad funcional de un ACV es la herramienta básica para la correcta comparación entre los diferentes sistemas, es decir, se emplea para la normalización de los datos de inventario. Se ha decidido establecer una unidad funcional de tipo físico de 100 gramos de ficocianina.

❖ **Límites del sistema**

El sistema de estudio será el mismo para ambas biorrefinerías, cambiando únicamente en la etapa final de revalorización de la biomasa residual, siendo para la biorrefinería 1 el proceso de licuefacción hidrotérmica, y para la biorrefinería 2 el proceso de digestión anaerobia. Las figuras 58 y 59 representan la división de los sistemas para ambas biorrefinerías con las etapas finales de HTL y DA, respectivamente; así como las consideraciones tenidas en cuenta para la realización del Análisis del Ciclo de Vida.

Con el objetivo de realizar correctamente la recolección de los datos de inventario se hace necesario el conocimiento de las entradas y salidas de los procesos que conforman cada etapa de la biorrefinería, es decir, conocer la extensión de sus límites. Un sistema está formado por un conjunto de etapas entre las que se establece algún tipo de relación que las articule en la unidad. Sus límites son las fronteras que enmarcan dicho sistema y son condicionados por las entradas y salidas.

Biorrefinería 1: Extracción y purificación de ficocianina + proceso de HTL de la biomasa residual.

Con respecto a las etapas que conforman esta biorrefinería, recogidas en la figura 58, primeramente, se realiza la extracción de ficocianina de la microalga de partida: *Arthrospira platensis*. Una vez realizada la extracción, se procede a centrifugar la mezcla, intentando que sea el menor tiempo posible siempre que la separación de la biomasa residual y el sobrenadante resultante (extracto crudo de PC) sea exitosa (10 minutos) y de esa forma reducir los costes asociados al proceso de centrifugación. A continuación, se lleva a cabo, por un lado, la purificación de la PC mediante técnicas como el ATPS, diálisis y la precipitación con sulfato de amonio, que no requieren de un aporte de energía significativo y que terminan generando la corriente de *ficocianina purificada*, y, por otro lado, la revalorización de la biomasa residual resultante mediante HTL, que permite obtener varias corrientes de producto entre ellas, el bioaceite y la fracción acuosa.

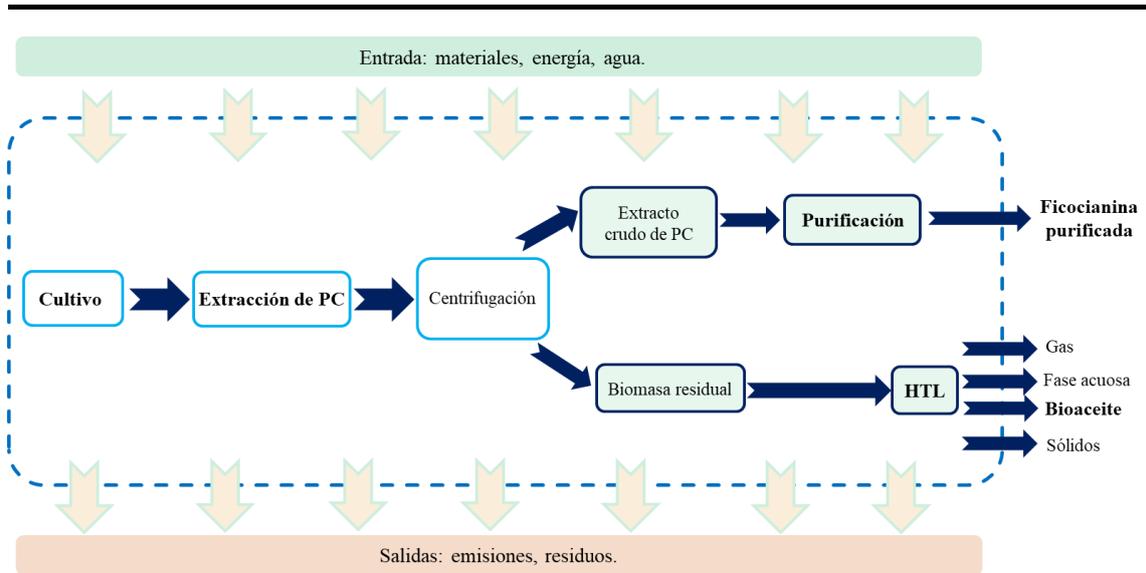


Figura 58. Límites del sistema de la biorrefinería 1 evaluada.

Biorrefinería 2: Extracción y purificación de ficocianina + proceso de digestión anaerobia de la biomasa residual.

Con respecto a las etapas que conforman la biorrefinería 2, recogidas en la figura 59, inicialmente, son idénticas a las etapas de la biorrefinería 1, únicamente difieren en la etapa final de revalorización de la biomasa residual resultante, que, en este caso, se hace mediante digestión anaerobia.

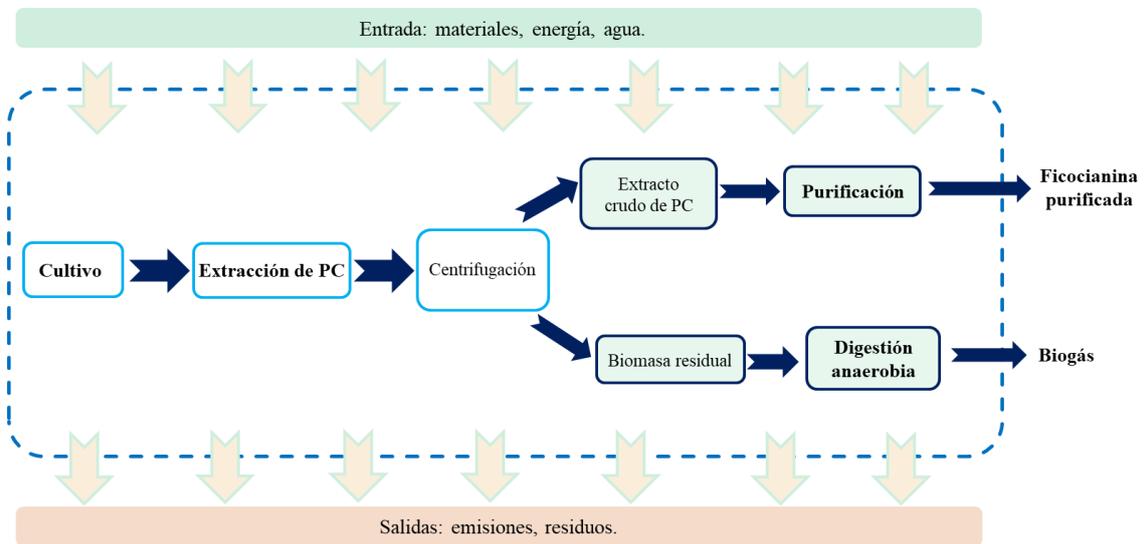


Figura 59. Límites del sistema de la biorrefinería 2 evaluada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de *Arthrospira platensis*

En primer lugar, se realizó la caracterización de la biomasa de partida de la cianobacteria *A. platensis*. Dicha caracterización comprende tanto su composición bioquímica como su análisis elemental (tabla 9) de acuerdo con el procedimiento detallado en el apartado 3.2.1.

Tabla 9. Composición de *Arthrospira platensis* (en base seca).

Composición bioquímica (%p/p)		Composición elemental (%p/p)	
Proteínas totales*	65,4 ± 1,8	C	47,2 ± 0,2
- Ficocianina	8,84 ± 0,06	H	6,59 ± 0,07
- Aloficocianina	3,25 ± 0,08	N	11,0 ± 0,1
- Ficoeritrina	1,69 ± 0,03	S	0,33 ± 0,03
Lípidos	11,2 ± 0,8	O	22,1 ± 0,4
Carbohidratos totales	19,4 ± 1,3		
Carbohidratos solubles	1,34 ± 0,01		
Cenizas	5,40 ± 0,15		

*Incluidas ficobiliproteínas.

Tanto la composición bioquímica como la composición elemental fueron similares a las encontradas en bibliografía para *A. platensis* [341]. Como ya se ha mencionado anteriormente, es una cianobacteria que se caracteriza por su alto contenido en proteínas (65%). En particular, destaca por la presencia de una de las ficobiliproteínas con mayor interés industrial, de estudio en la presente tesis doctoral: la ficocianina.

4.2. Extracción de ficocianina. Diseño de experimentos.

Como se mencionó en el apartado 3.1.1, con el propósito de maximizar la cantidad de ficocianina extraída mediante ultrasonidos y LI ([EMIM][EtSO₄]), se desarrolló un diseño factorial de experimentos del tipo central compuesto, centrado en las caras. Para llevarlo a cabo se evaluó el efecto de los siguientes factores: relación LI/Agua (LI/A), relación biomasa/disolvente (B/S), potencia (P) y tiempo de ultrasonidos (t). Por otra parte, las respuestas seleccionadas en el proceso de extracción fueron: cantidad extraída de ficocianina (E_{PC}), de aloficocianina (E_{APC}) y de ficoeritrina (E_{PE}), así como sus respectivas purezas (P_{PC}, P_{APC}, P_{PE}), junto con la cantidad de carbohidratos extraídos (E_{CH}).

Finalmente, el diseño factorial de experimentos (2⁴) se completó con cuatro puntos centrales y con los correspondientes ocho puntos estrella, resultando así, en un total de 28 experimentos, como se mostró previamente en la tabla 8 del apartado 3.1.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. Análisis estadístico

Una vez completados de forma experimental los 28 experimentos mencionados, los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Matriz del diseño de experimentos compuesto central para la extracción de ficobiliproteínas con los resultados obtenidos para cada una de las respuestas.

Exp. nº	Factores (valores codificados)				Respuestas						
	B	LI/A	P	t	EPC	EAPC	EPE	P _{PC}	P _{APC}	P _{PE}	ECH
					(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)				(mg/g)
1	-1	-1	-1	-1	18,4	5,6	1,6	0,2	0,1	0,1	8,8
2	1	-1	-1	-1	19,9	7,5	1,3	0,3	0,2	0,2	13,5
3	-1	1	-1	-1	47,6	8,9	4,0	0,4	0,2	0,2	12,3
4	1	1	-1	-1	46,3	12,6	3,7	0,5	0,2	0,3	17,5
5	-1	-1	1	-1	20,0	4,9	1,0	0,2	0,1	0,1	11,5
6	1	-1	1	-1	22,6	7,1	1,3	0,3	0,2	0,2	16,2
7	-1	1	1	-1	47,6	9,0	4,0	0,4	0,2	0,2	24,0
8	1	1	1	-1	49,1	13,3	3,8	0,5	0,2	0,3	16,5
9	-1	-1	-1	1	24,1	11,9	4,2	0,3	0,2	0,2	15,1
10	1	-1	-1	1	23,3	7,2	1,3	0,3	0,1	0,2	20,4
11	-1	1	-1	1	61,6	10,5	4,9	0,3	0,1	0,2	16,5
12	1	1	-1	1	64,8	19,2	6,1	0,6	0,2	0,3	21,1
13	-1	-1	1	1	28,0	14,1	2,7	0,3	0,1	0,1	14,9
14	1	-1	1	1	22,8	6,9	1,2	0,3	0,1	0,2	19,5
15	-1	1	1	1	67,7	15,3	5,7	0,4	0,2	0,2	14,1
16	1	1	1	1	58,6	20,5	6,0	0,5	0,3	0,3	20,7
17	-1	0	0	0	69,9	19,6	5,5	0,5	0,2	0,3	18,0
18	1	0	0	0	66,2	20,9	4,7	0,6	0,2	0,3	21,4
19	0	-1	0	0	24,1	9,0	1,8	0,3	0,1	0,1	14,8
20	0	1	0	0	67,6	18,5	5,3	0,5	0,2	0,3	15,2
21	0	0	-1	0	71,0	22,9	5,6	0,5	0,2	0,3	25,2
22	0	0	1	0	70,1	21,4	5,3	0,5	0,2	0,3	26,9
23	0	0	0	-1	55,7	16,0	4,3	0,5	0,2	0,2	15,2
24	0	0	0	1	71,7	24,4	6,1	0,5	0,2	0,3	28,6
25	0	0	0	0	68,6	20,9	5,3	0,6	0,2	0,3	16,7
26	0	0	0	0	69,7	22,0	5,4	0,5	0,2	0,3	18,3
27	0	0	0	0	69,1	21,1	5,3	0,6	0,2	0,3	16,3
28	0	0	0	0	67,2	20,9	5,3	0,6	0,2	0,3	16,9

En la tabla 10 se han recogido tanto los factores codificados (columnas 2 a 5) como las respuestas analizadas (columnas 6 a 12). Es importante destacar que los experimentos se realizaron al azar para minimizar tendencias sistemáticas en las variables y que el nivel de significación para la diferencia entre las medias fue del 95% (p -valor $< 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) del modelo de extracción de las ficobiliproteínas y carbohidratos, se presentan a continuación.

❖ Análisis de varianza (ANOVA)

Los valores experimentales que se han obtenido, mostrados en la tabla 10, se analizaron estadísticamente y se calcularon los efectos principales y los efectos de interacción de las variables (interacciones binarias). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de extracción de ficobiliproteínas y carbohidratos se resumen en las siguientes tablas (11-17) (teniendo en cuenta que los efectos/interacciones son significativos cuando p -valor $< 0,05$):

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) para la cantidad de ficocianina extraída (E_{PC}).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	p -valor
B/S	7,20418	1	7,20418	0,84	0,3770
LI/A	5256,58	1	5256,58	610,58	0,0000
P	4,95737	1	4,95737	0,58	0,4615
t	507,974	1	507,974	59	0,0000
(B/S) ²	6,14602	1	6,14602	0,71	0,4134
B/S - LI/A	0,914271	1	0,914271	0,11	0,7497
B/S - P	9,98829	1	9,98829	1,16	0,3010
B/S - t	16,2762	1	16,2762	1,89	0,1924
(LI/A) ²	1460,15	1	1460,15	169,61	0,0000
LI/A - P	1,51505	1	1,51505	0,18	0,6817
LI/A - t	125,664	1	125,664	14,6	0,0021
P ²	2,29134	1	2,29134	0,27	0,6146
P - t	0,805641	1	0,805641	0,09	0,7645
t ²	89,2599	1	89,2599	10,37	0,0067
Error total	111,918	13	8,60911		
Total	11311,1	27			

Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) para la cantidad de aloficocianina extraída (E_{APC}).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	p -valor
B/S	13,0683	1	13,0683	3,29	0,0930
LI/A	159,73	1	159,73	40,18	0,0000
P	2,0677	1	2,0677	0,52	0,4836
t	111,154	1	111,154	27,96	0,0001
(B/S) ²	5,57696	1	5,57696	1,4	0,2575
B/S - LI/A	55,2068	1	55,2068	13,89	0,0025
B/S - P	1,58716	1	1,58716	0,4	0,5384
B/S - t	6,51564	1	6,51564	1,64	0,2228
(LI/A) ²	165,673	1	165,673	41,67	0,0000
LI/A - P	2,32189	1	2,32189	0,58	0,4584
LI/A - t	2,71665	1	2,71665	0,68	0,4234
P ²	0,426544	1	0,426544	0,11	0,7485
P - t	4,14194	1	4,14194	1,04	0,3260
t ²	6,02323	1	6,02323	1,52	0,2402
Error total	51,6822	13	3,97555		
Total	1046,14	27			

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) para la cantidad de ficoeritrina extraída (E_{PE}).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	p-valor
B/S	0,961931	1	0,961931	3,36	0,0900
LI/A	40,667	1	40,667	141,86	0,0000
P	0,124867	1	0,124867	0,44	0,5208
t	9,72052	1	9,72052	33,91	0,0001
(B/S) ²	0,151418	1	0,151418	0,53	0,4802
B/S - LI/A	1,76279	1	1,76279	6,15	0,0276
B/S - P	0,091597	1	0,091597	0,32	0,5815
B/S - t	0,341231	1	0,341231	1,19	0,2951
(LI/A) ²	8,37536	1	8,37536	29,22	0,0001
LI/A - P	0,537289	1	0,537289	1,87	0,1942
LI/A - t	0,608868	1	0,608868	2,12	0,1687
P ²	0,0460853	1	0,0460853	0,16	0,6950
P -t	0,0057078	1	0,0057078	0,02	0,8899
t ²	0,0487213	1	0,0487213	0,17	0,6869
Error total	3,72668	13	0,286667		
Total	83,8079	27			

Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) para la pureza de ficocianina en el extracto (P_{FC}).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	p-valor
B/S	0,0460865	1	0,0460865	33,4	0,0001
LI/A	0,148041	1	0,148041	107,29	0,0000
P	8,23472E-05	1	8,23472E-05	0,06	0,8108
t	0,00131927	1	0,00131927	0,96	0,3460
(B/S) ²	5,55222E-05	1	5,55222E-05	0,04	0,8441
B/S - LI/A	0,00352242	1	0,00352242	2,55	0,1341
B/S - P	0,000001	1	0,000001	0	0,9789
B/S - t	0,00005776	1	0,00005776	0,04	0,8411
(LI/A) ²	0,0412511	1	0,0412511	29,9	0,0001
LI/A - P	0,00124609	1	0,00124609	0,9	0,3593
LI/A - t	0,00229441	1	0,00229441	1,66	0,2197
P ²	2,96343E-05	1	2,96343E-05	0,02	0,8857
P -t	4,6225E-06	1	4,6225E-06	0	0,9547
t ²	0,00461766	1	0,00461766	3,35	0,0904
Error total	0,0179379	13	0,00137984		
Total	0,370649	27			

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) para la pureza de aloficocianina en el extracto (P_{APC}).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	<i>p</i> -valor
B/S	0,0127095	1	0,0127095	27,41	0,0002
LI/A	0,0127893	1	0,0127893	27,58	0,0002
P	2,9389E-05	1	2,9389E-05	0,06	0,8052
t	0,00208228	1	0,00208228	4,49	0,0539
(B/S) ²	1,9512E-05	1	1,9512E-05	0,04	0,8407
B/S - LI/A	0,00424452	1	0,00424452	9,15	0,0098
B/S - P	3,4225E-06	1	3,4225E-06	0,01	0,9328
B/S - t	0,00023562	1	0,00023562	0,51	0,4886
(LI/A) ²	0,00835132	1	0,00835132	18,01	0,0010
LI/A - P	0,0008439	1	0,0008439	1,82	0,2004
LI/A - t	0,0005546	1	0,0005546	1,2	0,2940
P ²	1,0314E-05	1	1,0314E-05	0,02	0,8837
P -t	7,1403E-05	1	7,1403E-05	0,15	0,7011
t ²	0,00087333	1	0,00087333	1,88	0,1932
Error total	0,00602872	13	0,00046375		
Total	0,0723823	27			

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) para la pureza de ficoeritrina en el extracto (P_{PE}).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	<i>p</i> -valor
B/S	0,00834201	1	0,00834201	14,03	0,0024
LI/A	0,0446407	1	0,0446407	75,09	0,0000
P	0,0002191	1	0,0002191	0,37	0,5543
t	0,00112654	1	0,00112654	1,89	0,1919
(B/S) ²	6,6183E-06	1	6,6183E-06	0,01	0,9176
B/S - LI/A	0,0025553	1	0,0025553	4,3	0,0586
B/S - P	0,00008464	1	0,00008464	0,14	0,7120
B/S - t	4,00E-08	1	4,00E-08	0	0,9936
(LI/A) ²	0,0103513	1	0,0103513	17,41	0,0011
LI/A - P	0,00091204	1	0,00091204	1,53	0,2374
LI/A - t	0,00077841	1	0,00077841	1,31	0,2732
P ²	1,8139E-05	1	1,8139E-05	0,03	0,8640
P -t	2,2563E-05	1	2,2563E-05	0,04	0,8486
t ²	0,00084022	1	0,00084022	1,41	0,2558
Error total	0,00772872	13	0,00059452		
Total	0,101461	27			

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) para la cantidad extraída de carbohidratos (E_{CH}).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	p-valor
B/S	55,2931	1	55,2931	4,63	0,0507
LI/A	30,0522	1	30,0522	2,52	0,1365
P	10,9731	1	10,9731	0,92	0,3550
t	68,7069	1	68,7069	5,76	0,0321
(B/S) ²	7,53202	1	7,53202	0,63	0,4411
B/S - LI/A	6,70991	1	6,70991	0,56	0,4666
B/S - P	8,04233	1	8,04233	0,67	0,4264
B/S - t	1,21E+01	1	1,21E+01	1,01	0,3331
(LI/A) ²	106,572	1	106,572	8,93	0,0105
LI/A - P	0,804161	1	0,804161	0,07	0,7992
LI/A - t	20,3329	1	20,3329	1,7	0,2144
P ²	54,1875	1	54,1875	4,54	0,0527
P - t	25,2531	1	25,2531	2,12	0,1694
t ²	0,58651	1	0,58651	0,05	0,8280
Error total	155,088	13	11,9299		
Total	566,165	27			

Según el análisis estadístico dentro del rango experimental evaluado, la relación LI/A, (LI/A)² y el tiempo de ultrasonicación fueron los factores más significativos. Con respecto a la cantidad de ficobiliproteínas extraídas, la interacción LI/A-t y el factor cuadrático t² solo fueron significativos para la cantidad de PC extraída (*p*-valor = 0,0021 y 0,0067, respectivamente).

Por otro lado, la interacción entre las relaciones B/S y LI/A fue significativa para la cantidad extraída de aloficocianina y ficoeritrina (*p*-valor = 0,0025 y 0,028, respectivamente).

Con respecto a la pureza de las ficobiliproteínas, los factores B/S y LI/A fueron los únicos efectos principales significativos, mientras que la interacción (LI/A)² también resultó significativa. En cuanto a la cantidad de carbohidratos extraídos, el tiempo de sonicación fue el factor principal más significativo junto con el efecto cuadrático de la interacción (LI/A).

❖ Modelos matemáticos

A continuación, los resultados experimentales se ajustaron a un modelo de análisis de regresión múltiple no lineal, asumiendo un modelo polinómico de segundo orden, obteniendo así las ecuaciones matemáticas. Todos los factores se expresan en valores codificados y las ecuaciones son válidas dentro del rango [-1, +1]. En los modelos obtenidos se incluyen únicamente los factores cuyo efecto se ha considerado significativo, como resultado del análisis de varianza correspondiente (ecuaciones 35-41).

$$E_{PC} = 69,220 + 17,089 \cdot LI/A + 5,312 \cdot t - 23,792 \cdot LI/A^2 + 2,802 \cdot LI/A \cdot t - 5,882 \cdot t^2$$

($R^2=0,9901$). Ecuación 35

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$$E_{APC} = 21,546 + 2,979 \cdot LI/A + 2,485 \cdot t + 1,858 \cdot B/S \cdot LI/A - 8,014 \cdot LI/A^2 \quad (R^2=0,9506).$$

Ecuación 36

$$E_{PE} = 5,339 + 1,503 \cdot LI/A + 0,735 \cdot t + 0,332 \cdot B/S \cdot LI/A - 1,802 \cdot LI/A^2 \quad (R^2=0,9555).$$

Ecuación 37

$$P_{PC} = 0,539 + 0,051 \cdot B/S + 0,091 \cdot LI/A - 0,126 \cdot LI/A^2 \quad (R^2=0,9516). \quad \text{Ecuación 38}$$

$$P_{APC} = 0,239 + 0,027 \cdot B/S + 0,027 \cdot LI/A + 0,016 \cdot B/S \cdot LI/A - 0,057 \cdot LI/A^2 \quad (R^2=0,9167).$$

Ecuación 39

$$P_{PE} = 0,2724 + 0,0215 \cdot B/S + 0,050 \cdot LI/A - 0,063 \cdot LI/A^2 \quad (R^2=0,9238). \quad \text{Ecuación 40}$$

$$E_{CH} = 19,686 + 1,954 \cdot t - 6,428 \cdot LI/A^2 \quad (R^2=0,7261). \quad \text{Ecuación 41}$$

En todos los casos, excepto para la cantidad de carbohidratos extraída, los valores de R^2 asociados al ajuste de los modelos fueron satisfactorios ($R^2 > 0,9$). Con respecto a la cantidad de carbohidratos extraídos, el valor de R^2 más bajo (0,73) probablemente se debió a los errores experimentales relativos asociados con el muy bajo contenido de carbohidratos solubles (1,34% p/p) en la biomasa de partida de *Arthrospira platensis* (tabla 9).

4.2.3. Influencia de las condiciones de operación sobre la extracción de ficocianina

Con el fin de evaluar la influencia de cada factor, así como la influencia de las interacciones binarias entre ellos, sobre la extracción de ficocianina, se analizaron dos de las variables de respuesta de interés para el caso de la ficocianina como son la cantidad y la pureza de ésta (E_{PC} , P_{PC}) en función a cada uno de los factores. En primer lugar, se analizarán los efectos principales en la cantidad de ficocianina extraída, así como en su pureza (figura 60).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

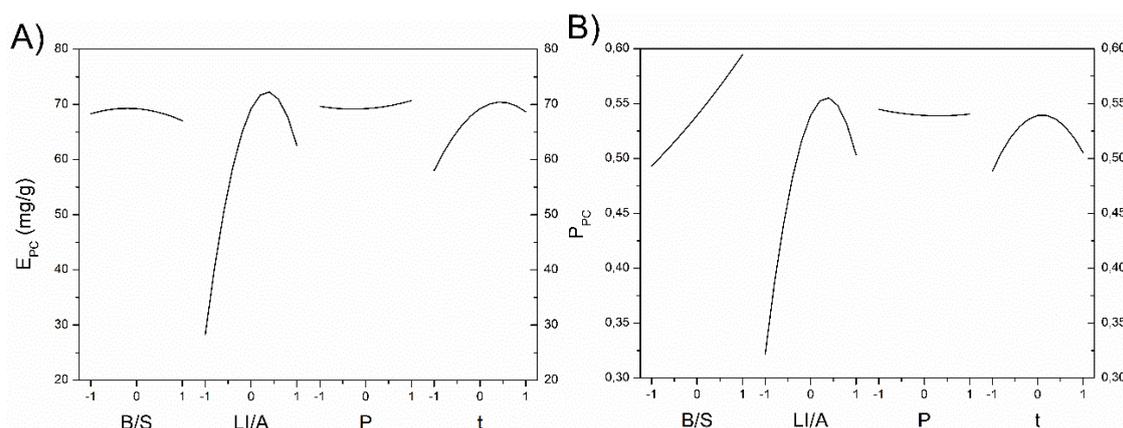


Figura 60. Efectos principales de los factores sobre la cantidad extraída E_{PC} (A) y la pureza P_{PC} (B) de ficocianina.

La figura 60 muestra los efectos principales sobre la cantidad de ficocianina extraída y su pureza. Como se muestra en la figura 60 (A), el factor con mayor efecto sobre la cantidad de ficocianina extraída fue la relación LI/A y el tiempo de ultrasonido.

Con respecto al primero, el efecto de la relación LI/A sobre la cantidad de PC extraída es positivo (ecuación 35). En este caso la cantidad de ficocianina extraída aumenta al aumentar la cantidad de líquido iónico hasta alcanzar un máximo de ~ 72 mg/g a una relación de LI/A del 15% aproximadamente, que corresponde al valor central de este factor. Sin embargo, el efecto cuadrático de la relación LI/A tiene una influencia negativa significativa en la cantidad extraída de PC (tabla 11, ecuación 35). El aumento de esta variable operativa no produjo un aumento constante en la cantidad de PC extraída, tal y como se muestra en la figura 60. La disminución que se observa a valores más elevados de la relación LI/A, está relacionada con el aumento del pH (>8) medido en dicho experimento con respecto al medido en el experimento del punto central (pH = 7,2). Este pH conduce a la desnaturalización de las proteínas como se ha podido comprobar en el laboratorio y como está publicado en literatura [147].

Con respecto al tiempo de ultrasonidos, cabe destacar que también influyó positivamente en la cantidad de ficocianina extraída. El efecto cuadrático del tiempo de sonicación es significativamente negativo (tabla 11, ecuación 35), por ello, hay un máximo para esta respuesta ($E_{PC} \sim 70$ mg/g) cerca del valor central del tiempo de sonicación (aproximadamente 20 minutos). Sin embargo, este factor dejará de influir para tiempos más largos, y dejará de ser significativo. Para la cantidad de ficocianina extraída, el resto de las variables (B/S y P) no son significativas, tal y como se observó en la tabla ANOVA (tabla 11).

De forma paralela, los efectos principales de la pureza de PC se representan en la figura 60 (B). De igual forma que sucedía con la cantidad, uno de los factores con mayor efecto es la relación LI/A. La pureza de la PC aumenta según aumenta la cantidad de LI, aumentando de 0,33 (sin líquido iónico) a 0,55 en el punto central de este factor (LI/A $\sim 15\%$ p/p). A una relación LI/A

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

más alta, la pureza disminuye como resultado de la influencia negativa del efecto cuadrático del factor LI/A (tabla 14, ecuación 38).

Otro de los factores con mayor efecto sobre la pureza de PC es la relación B/S, conforme aumenta esta relación se mejora la pureza. Concretamente, al aumentar la relación B/S se consigue aumentar la pureza desde 0,49 hasta 0,59, esto puede deberse a que a valores altos de B/S el disolvente será más selectivo hacia la PC (no presentando tanta afinidad por el resto de las proteínas), tal y como se vio en el apartado 1.2.8.2.

A continuación, en la gráfica 61 se presentan las interacciones binarias para la cantidad de ficocianina extraída (E_{PC}) y la pureza de la misma (P_{PC}).

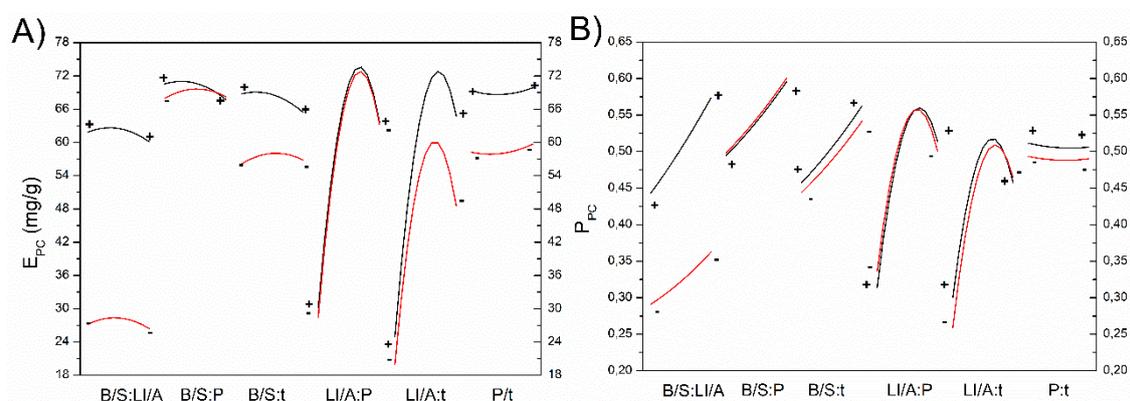


Figura 61. Gráfico de interacciones binarias entre factores sobre la cantidad extraída E_{PC} (A) y pureza de ficocianina P_{PC} (B).

La figura 61 muestra las interacciones binarias de las respuestas: cantidad de PC extraída y pureza de PC (E_{PC} y P_{PC}). Cada pareja de curvas de interacción \pm se obtuvo usando el modelo codificado donde el primer factor actúa como variable y el segundo factor se fija en +1 y -1, respectivamente. Las curvas paralelas o con la misma tendencia, indican que las interacciones binarias entre esos dos factores no son significativas. En este caso, por lo tanto, el único efecto de interacción significativo se puede observar entre LI/A y el tiempo de ultrasonidos para la cantidad de ficocianina extraída (E_{PC}) (figura 61, A), mientras que no hay interacciones significativas para la pureza de ficocianina (P_{PC}) (figura 61, B). Esto se puede corroborar con las tablas ANOVA (tabla 11 y 14).

4.2.4. Superficies de respuesta

A continuación, se muestran las superficies de respuesta para los valores predichos de las variables seleccionadas (figura 62: A, C y E): cantidad de ficobiliproteína extraída; figura 62: B, D y F): pureza de ficobiliproteína y figura 62: G: cantidad de carbohidratos extraídos) en función de dos de los factores, con los otros dos en su valor central (codificado como 0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

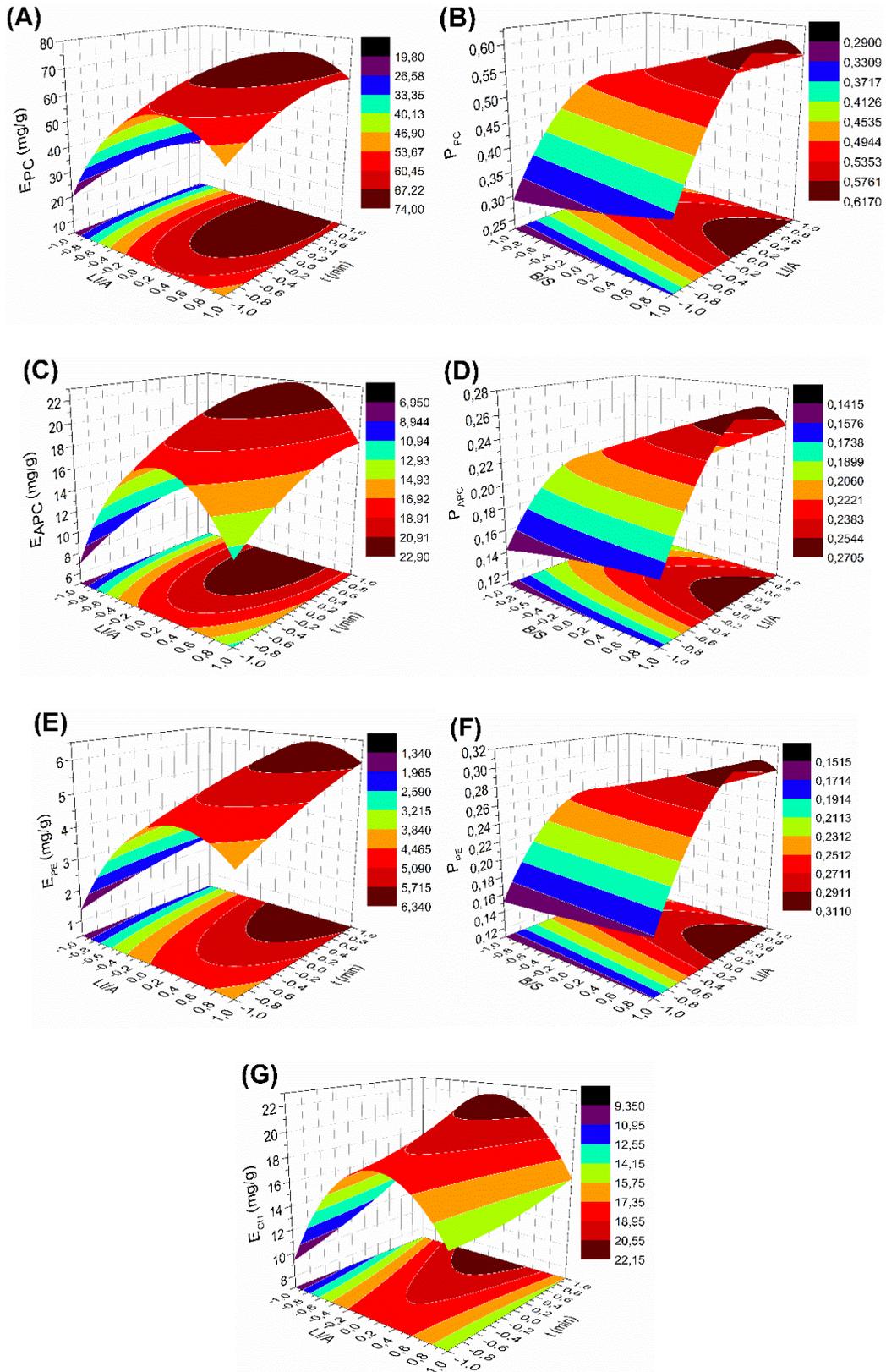


Figura 62. Superficies de respuesta para la cantidad extraída de ficocianina (EPC) (A); y su pureza (P_{pc}) (B); cantidad de aloficocianina extraída (E_{APC}) (C) y su pureza (P_{APC}) (D); cantidad de ficoeritrina extraída (E_{Pe}) (E); y su pureza (P_{Pe}) (F), y cantidad extraída de carbohidratos (E_{CH}) (G).

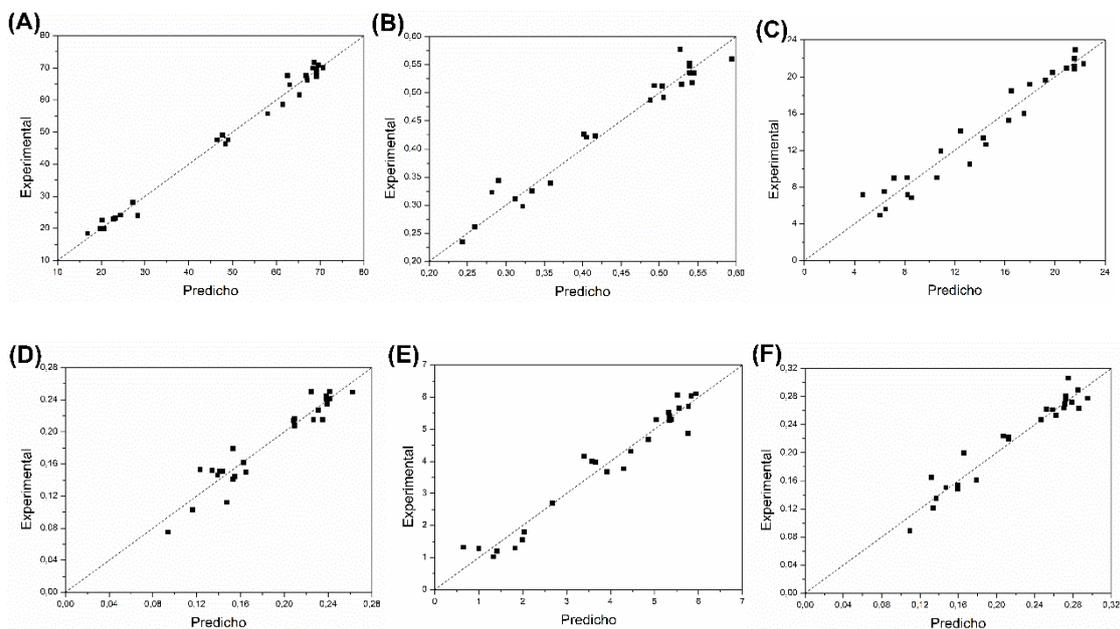
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar, existe un máximo para la cantidad extraída de cada ficobiliproteína (figura 62) situado aproximadamente cerca de valores intermedios de LI/A. Al analizar el efecto del tiempo sobre las respuestas, se observa que todas estas aumentan con el tiempo hasta alcanzar un máximo, manteniéndose o disminuyendo ligeramente para tiempos mayores. Además, económicamente no es rentable llevar a cabo el proceso con tiempos muy altos.

Al analizar la pureza de las ficobiliproteínas (figura 62 (B), (D) y (F)), se puede observar cómo un aumento en el factor LI/A incrementó significativamente los valores de pureza para todas las ficobiliproteínas. También se puede apreciar que valores altos del factor B/S consiguieron maximizar los valores de las purzas.

Con respecto a la cantidad de carbohidratos extraída, el factor LI/A, tiene un gran efecto a valores medios, pero es perjudicial a valores altos. Relaciones de LI/A altas, implica una mayor cantidad de LI, pero esto tiene un efecto negativo para la extracción de carbohidratos. Esto es debido a que, desafortunadamente, los carbohidratos son poco solubles en casi todos los disolventes (incluidos los LIs) excepto en el agua [414]. Con lo que al aumentar la concentración de LI disminuye la solubilidad de éstos en la disolución de LI/A.

La figura 63 muestra la comparativa entre los valores experimentales y los valores predichos para todas las respuestas: cantidad de ficobiliproteínas extraídas, pureza de las ficobiliproteínas y cantidad de carbohidratos extraídos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

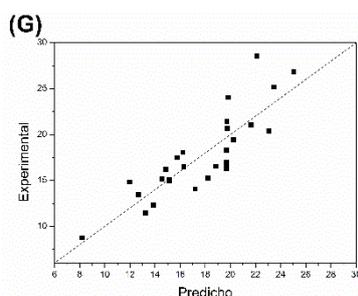


Figura 63. Representación de los valores experimentales frente a los predichos por el modelo para las siguientes respuestas: cantidad de ficocianina extraída (E_{PC}) (A) y su pureza (P_{PC}) (B); cantidad de aloficocianina extraída (E_{APC}) (C) su pureza (P_{APC}) (D); cantidad de ficoeritrina (E_{PE}) (E) y su pureza (P_{PE}) (F), y cantidad extraída de carbohidratos (E_{CH}) (G).

Para todas las respuestas, los valores calculados con los modelos predictivos no lineales fueron muy semejantes a los obtenidos experimentalmente, lo que indica la precisión de los modelos, exceptuando la cantidad de carbohidratos extraídos, como se explicó anteriormente.

4.2.5. Condiciones óptimas para la extracción de ficocianina

La optimización de las condiciones del proceso de extracción se ha centrado en maximizar la cantidad de ficocianina extraída (E_{PC}) manteniendo unos valores de pureza razonables, obteniendo los valores óptimos que se muestran en la siguiente tabla (tabla 18). Usando los modelos matemáticos (ecuaciones 35-41, mostradas previamente) los valores teóricos para todas las respuestas se pudieron calcular para estos valores óptimos (tabla 18).

Tabla 18. Valores óptimos codificados de los factores que maximizan cada respuesta.

Factor	Respuestas						
	E_{PC}	E_{APC}	E_{PE}	P_{PC}	P_{APC}	P_{PE}	E_{CH}
B/D	-0,68	0,12	-0,27	1,00	1,00	1,00	0,33
LI/A	0,39	0,25	0,46	0,45	0,44	0,53	-0,04
Potencia	1,00	1,00	-0,88	1,00	1,00	1,00	-1,00
Tiempo	0,58	0,99	1,00	0,05	0,22	-0,13	1,00
Máximo	75,9 mg/g	24,2 mg/g	6,5 mg/g	0,62	0,28	0,32	28,1

En estas condiciones de operación, los valores previstos para el resto de respuestas fueron lo suficientemente altos como para justificar esta elección: se esperan que las respuestas E_{APC} y E_{PC} alcancen el 93% y el 94% de sus valores máximos, respectivamente.

A continuación, el experimento de extracción en condiciones óptimas se llevó a cabo por triplicado (0,18 g de *A. platensis*, 20,86 % p/p LI/A, 80 % de potencia en el ultrasonidos y 25 minutos), y se obtuvo un valor experimental de E_{PC} de $76,6 \pm 0,4$ mg/g, que coincidió con el valor predicho de E_{PC} (75,9 mg/g, tabla 18).

4.2.6. Comparativa con otros trabajos anteriores

Se realizó la comparativa de los resultados del presente trabajo con otros publicados en bibliografía que utilizaban ultrasonidos o microondas combinados con líquidos iónicos para realizar la extracción de ficocianina (figura 64).

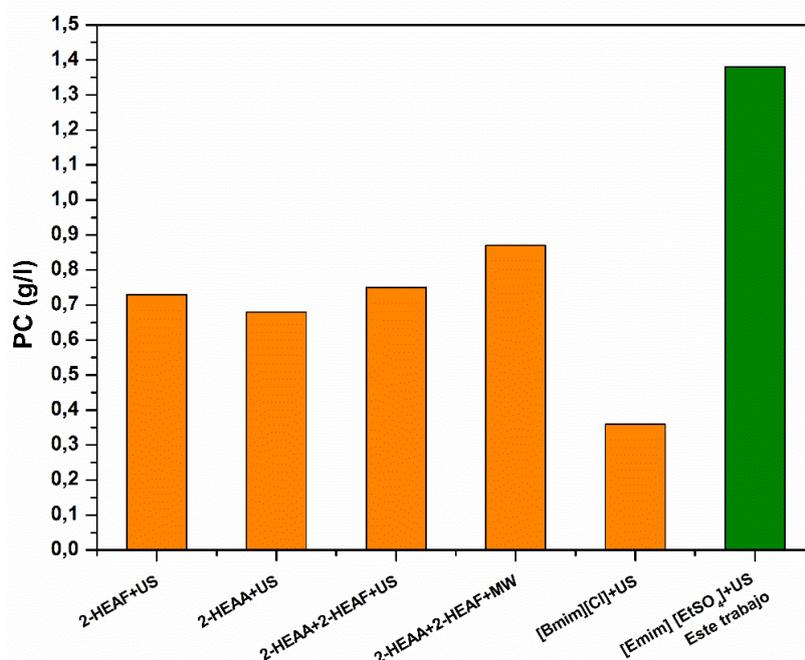


Figura 64. Comparación de valores de ficocianina extraídos por Pinto y colaboradores [147,148] y la presente tesis doctoral (US: ultrasonidos; MW: microondas).

La figura 64 compara el valor de cantidad de PC extraída alcanzado en la presente tesis doctoral y los publicados en literatura, los cuales fueron obtenidos con otros LIs (acetato de 2-hidroxiethylamonio (2-HEAA), formiato de 2-hidroxiethylamonio (2-HEAF), su mezcla (2-HEAA+2-HEAF) y 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM][Cl]) [147,148]. Como se puede observar el uso de [EMIM][EtSO₄] mejoró notablemente la extracción de PC, demostrando así no solo la capacidad de este LI para romper la pared celular de las microalgas tal y como aparece publicado en bibliografía [415] sino la alta capacidad de extracción de ficocianina.

4.2.7. Proceso de extracción con otros líquidos iónicos

Pese a que el uso de [EMIM][EtSO₄] ha demostrado ser adecuado para la disrupción de la pared celular de las cianobacterias [415] y eficaz en la extracción de ficocianina, se han estudiado otros dos líquidos iónicos cuyo catión está formado por una cadena alquílica de mayor longitud: [BMIM][MeSO₄] y [BMIM][Cl]. El primero de ellos ha demostrado ser eficaz en la extracción de lípidos [416] y el segundo de ficobiliproteínas [147] Para este estudio se han empleado las condiciones óptimas obtenidas mediante el diseño de experimentos descrito anteriormente, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 65.

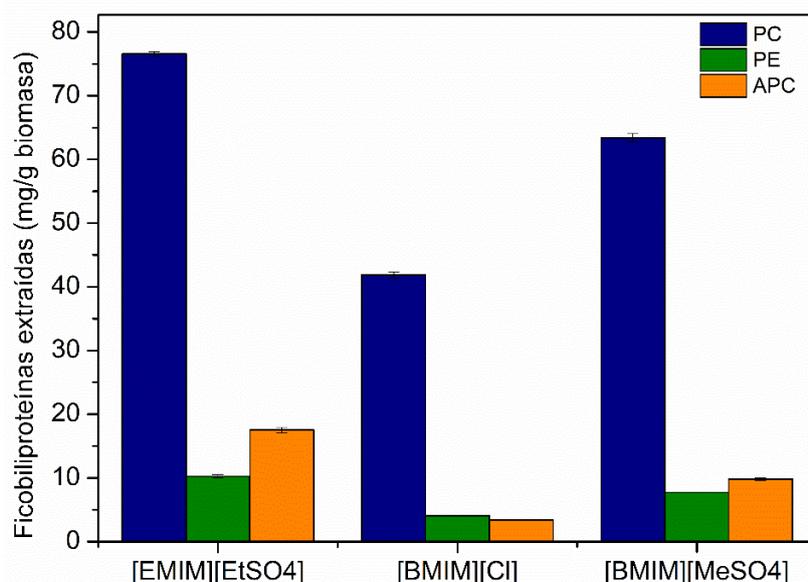


Figura 65. Extracción de ficobiliproteínas con distintos LIs.

Como puede comprobarse, el [EMIM][EtSO₄] fue el LI que más cantidad de ficocianina extrajo ya que rompe mucho mejor la pared celular. Por ende, también fue el LI que más ficoeritrina y aloficocianina extrajo. Estos tres LIs tienen en común que todos son apróticos y de tipo imidazol. Sin embargo, se diferencian en el tipo de catión, ya que el [BMIM][MeSO₄] y [BMIM][Cl] comparten el mismo un imidazol y un radical butilo, mientras que el [EMIM][EtSO₄] está formado por un imidazol y un radical etilo.

La diferencia en la longitud de la cadena alquílica del catión es la causante de la gran diferencia en la capacidad de extracción de la ficocianina. Esto es debido a que la hidrofobicidad del LI aumenta con la longitud de la cadena. Por ello, los LIs con cadenas alquílicas más cortas son más hidrófilos y, por tanto, más afines a las ficobiliproteínas, que son altamente hidrosolubles [195].

4.3. Recuperación y reutilización del líquido iónico

Tal y como se mencionó en el apartado 3.1.2, el líquido iónico utilizado en el proceso de extracción se recuperó utilizando un procedimiento basado en diálisis y fue reutilizado en posteriores extracciones, para comprobar así si su capacidad de extracción se mantenía. En la figura 66 se muestran los ciclos de reutilización del [EMIM][EtSO₄] en distintos ciclos de extracción consecutivos.

Para poder estudiar la integridad del LI, éste fue analizado por ATR-FTIR obteniendo los resultados representados en la figura 67.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

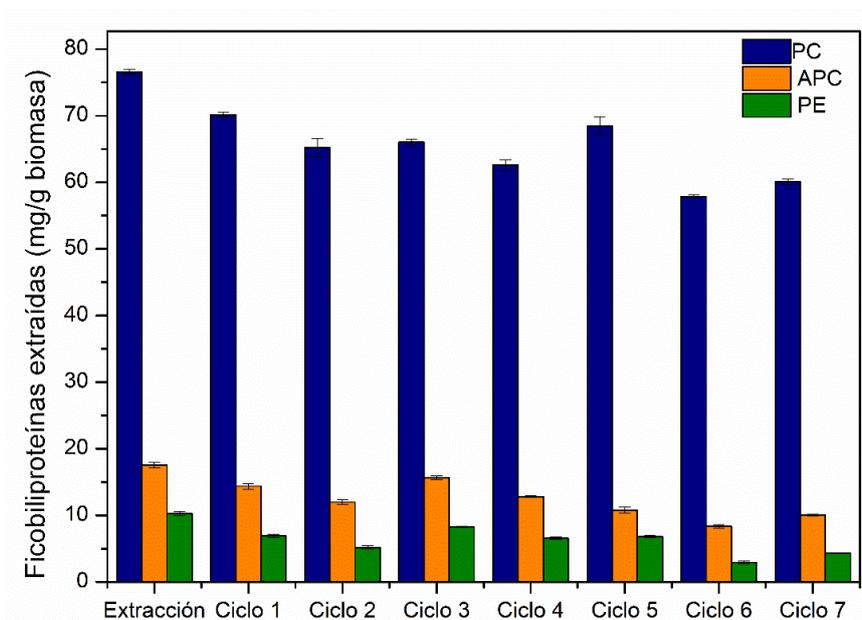


Figura 66. Ciclos de reutilización del líquido iónico en distintas extracciones de ficobiliproteínas.

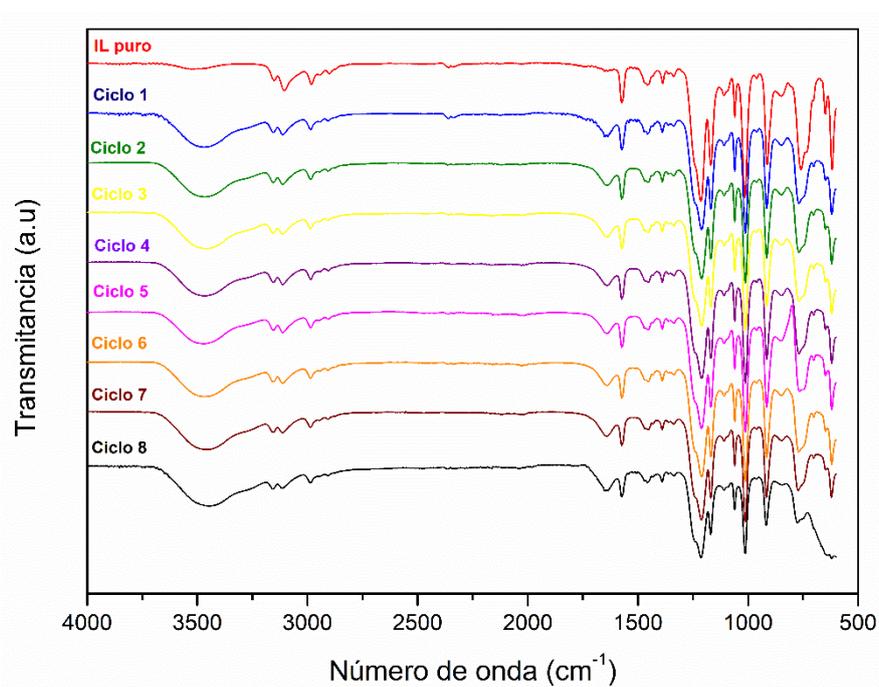


Figura 67. Análisis de ATR-FTIR del LI reutilizado en cada uno de los ciclos.

Como se puede apreciar en la figura 66, el LI se pudo reutilizar con éxito durante 7 ciclos de extracción, mostrando el mismo espectro IR característico del LI puro (exceptuando el pico centrado alrededor de 3500 cm^{-1} correspondiente al agua restante en la recuperación del LI).

Después del último ciclo de extracción (ciclo 7) el LI ya no ha mostrado el pico centrado en 620 cm^{-1} que es característico de la flexión $\text{C}_2\text{-N-C}_5$ del anillo de imidazol (gráfica 67) [417]. Sin embargo, la cantidad de ficocianina extraída en el séptimo ciclo solo fue un 21% menor que después del primer uso de éste. Por ese motivo, la reutilización del LI durante al menos 7 ciclos

de extracción puede resultar clave en el proceso global debido al alto coste del mismo.

En otros trabajos, como en el de Rodrigues y colaboradores [147] se obtuvieron valores por debajo de 0,8 g/L de PC (LI puro 2-HEAA + 2-HEAF + ultrasonidos), cayendo a valores de 0,05 g/L de PC después de 3 ciclos. Por otro lado, Pinto y colaboradores [148] alcanzaron valores de 0,87 g/L de PC (LI puro 2-HEAA + 2-HEAF + microondas), reduciéndose hasta 0,18 g/L de PC después de tres ciclos. Comparando con estos valores bibliográficos, los resultados de la presente tesis doctoral fueron superiores, con valores por encima de 1 g/L de ficocianina después de siete ciclos de recuperación y reutilización del LI.

Al comparar la cantidad de ficocianina extraída mediante el LI [EMIM][EtSO₄], estudiado en la presente tesis, con la cantidad de ficocianina extraída con otros disolventes, se observan valores similares ya que con otros disolventes se extraía una cantidad en torno a 80 mg/g de ficocianina. Sin embargo, el método basado en LI presenta como ventaja la posibilidad de reutilizar el disolvente para ciclos de extracción posteriores. Estos resultados son de gran relevancia en el campo de la biorrefinería y de la economía circular ya que permite la reducción del consumo de este disolvente, mejorando así la sostenibilidad del proceso.

Por este motivo, este proceso resultó muy interesante para integrarlo en el marco de una biorrefinería para la obtención de ficocianina a partir de la biomasa de *Arthrospira platensis*. De cara a la integración de este proceso en una biorrefinería, se ha de analizar y caracterizar la biomasa residual resultante, tal y como se muestra en el *apartado 4.6*.

4.4. Sistemas de dos fases acuosas (ATPS)

Tal y como se describió en el *apartado 3.1.2*, el primer paso para el estudio del proceso de separación de la ficocianina mediante un sistema ATPS fue el estudio de las condiciones del sistema sal-LI-agua. El objetivo era trabajar en un sistema bifásico, y para ello se han construido las curvas binodales o curvas de equilibrio, empleando el procedimiento descrito en la metodología.

❖ Curvas binodales

En la figura 68 se presenta la curva binodal característica del líquido iónico [EMIM][EtSO₄], empleado en la extracción, construida mediante el método del punto de niebla (descrito en el *apartado 3.1.2*).

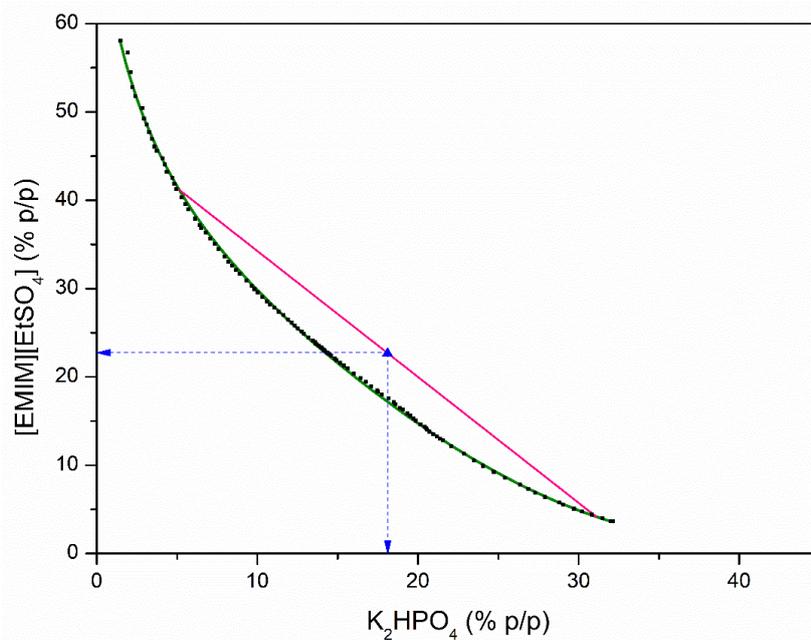


Figura 68. Curva binodal de equilibrio sal-LI-agua para el LI [EMIM][EtSO₄] y la sal K₂HPO₄. Los puntos negros (■) son los datos experimentales de la curva binodal, la línea verde es el ajuste a la ecuación de Merchuk, la línea rosa es la *tie-line* o recta de reparto y el triángulo azul (▲) es el punto medio de la *tie-line*, donde el volumen de la fase superior es igual al de la fase inferior ($V_{TOP} = V_{BOTTOM}$).

En la curva binodal mostrada en la figura 68, se ha comprobado experimentalmente que los puntos por encima de la curva de equilibrio corresponden a un sistema bifásico, es decir, se forman dos fases acuosas, necesarias para la separación de la PC. Sin embargo, por debajo de la curva de equilibrio se formará un sistema monofásico en el cual no se conseguirá ningún tipo de separación de dicho biocompuesto.

Los datos experimentales de la curva de equilibrio (puntos de color negro) se han ajustado a la ecuación de Merchuk (línea verde). De esta forma se obtuvieron los parámetros A, B, C para la curva de equilibrio y para este sistema ATPS el ajuste al modelo de Merchuk fue totalmente satisfactorio obteniendo unos valores de R² mayores de 0,999 (tabla 19).

Por otro lado, para la determinación de la recta de reparto se resolvió el sistema de ecuaciones ya mencionado en la metodología (ecuaciones 4-8) y se obtuvieron así, los puntos de corte de la recta de reparto con la curva de equilibrio (Y_T , Y_B , X_T , X_B).

Tal y como se hizo para la extracción de ficocianina, se utilizaron los LIs [BMIM][Cl] y [BMIM][MeSO₄] en el sistema de dos fases acuosas. Para ello, de igual forma, se determinaron las curvas binodales de equilibrio (figuras 69-70).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

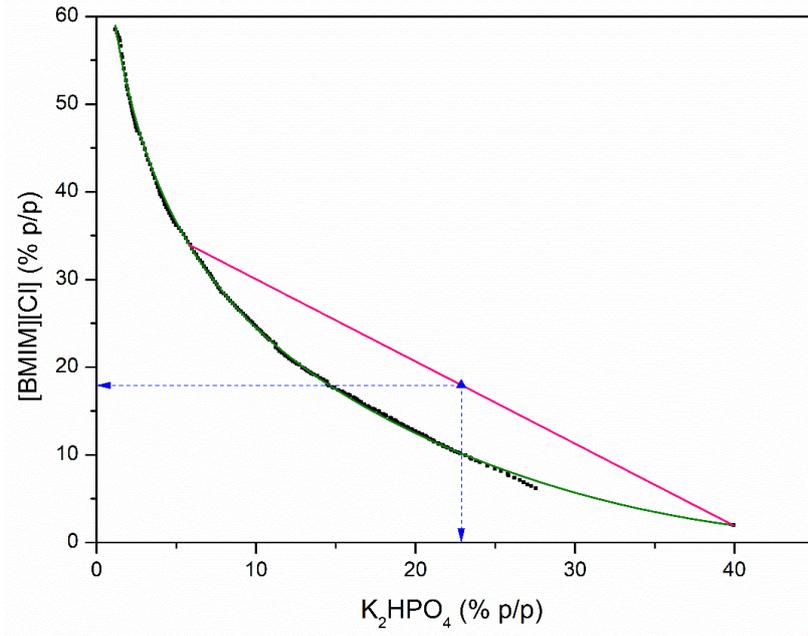


Figura 69. Curva binodal de equilibrio sal-LI-agua para el LI [BMIM][Cl] y la sal K_2HPO_4 . Los puntos negros (■) son los datos experimentales de la curva binodal, la línea verde es el ajuste a la ecuación de Merchuk, la línea rosa es la *tie-line* o recta de reparto y el triángulo azul (▲) es el punto medio de la *tie-line*, donde el volumen de la fase superior es igual al de la fase inferior ($V_{TOP} = V_{BOTTOM}$).

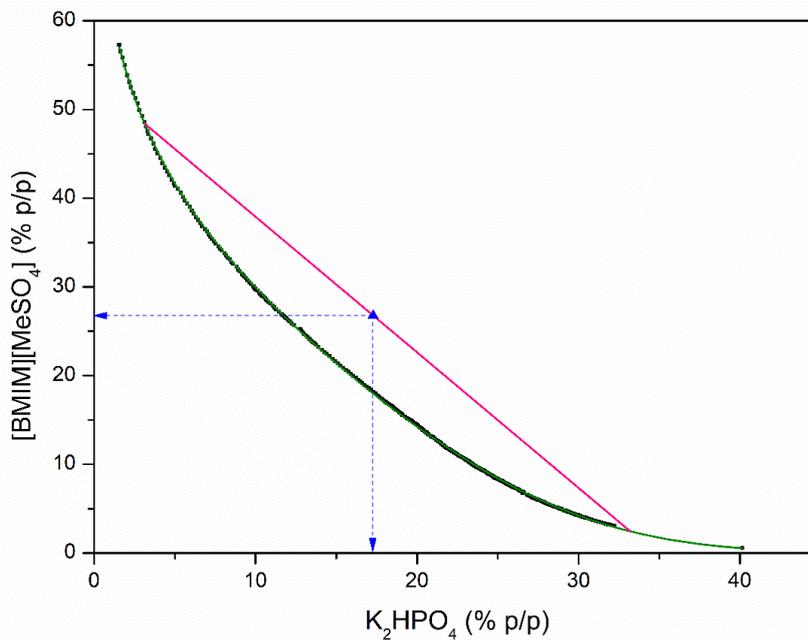


Figura 70. Curva binodal de equilibrio sal-LI-agua para el LI [BMIM][MeSO₄] y la sal K_2HPO_4 . Los puntos negros (■) son los datos experimentales de la curva binodal, la línea verde es el ajuste a la ecuación de Merchuk, la línea rosa es la *tie-line* o recta de reparto y el triángulo azul (▲) es el punto medio de la *tie-line*, donde el volumen de la fase superior es igual al de la fase inferior ($V_{TOP} = V_{BOTTOM}$).

Para ambos sistemas ATPS el ajuste al modelo de Merchuk fue satisfactorio obteniendo unos valores de R^2 mayores de 0,999 (tabla 19).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se estudió el efecto de la cadena alquílica del catión del LI [EMIM][EtSO₄] mediante los siguientes líquidos iónicos: [BMIM][EtSO₄], [HMIM][EtSO₄], [OMIM][EtSO₄] fue necesaria la elaboración de las correspondientes curvas binodales asociadas al uso de estos LIs, que se presentan a continuación (figuras 71-73).

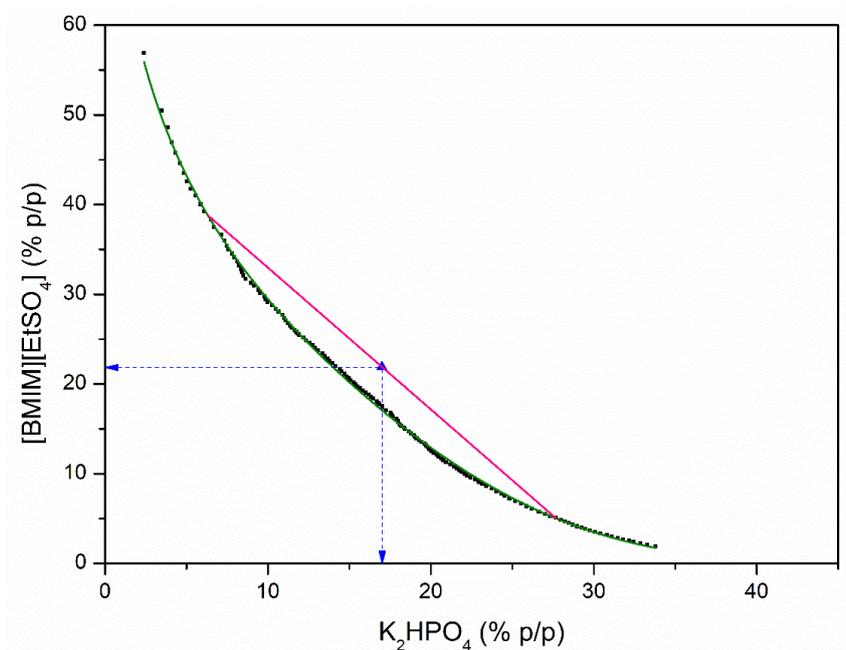


Figura 71. Curva binodal de equilibrio sal-LI-agua para el LI [BMIM][EtSO₄] y la sal K₂HPO₄. Los puntos negros (■) son los datos experimentales de la curva binodal, la línea verde es el ajuste a la ecuación de Merchuk, la línea rosa es la *tie-line* o recta de reparto y el triángulo azul (▲) es el punto medio de la *tie-line*, donde el volumen de la fase superior es igual al de la fase inferior ($V_{TOP} = V_{BOTTOM}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

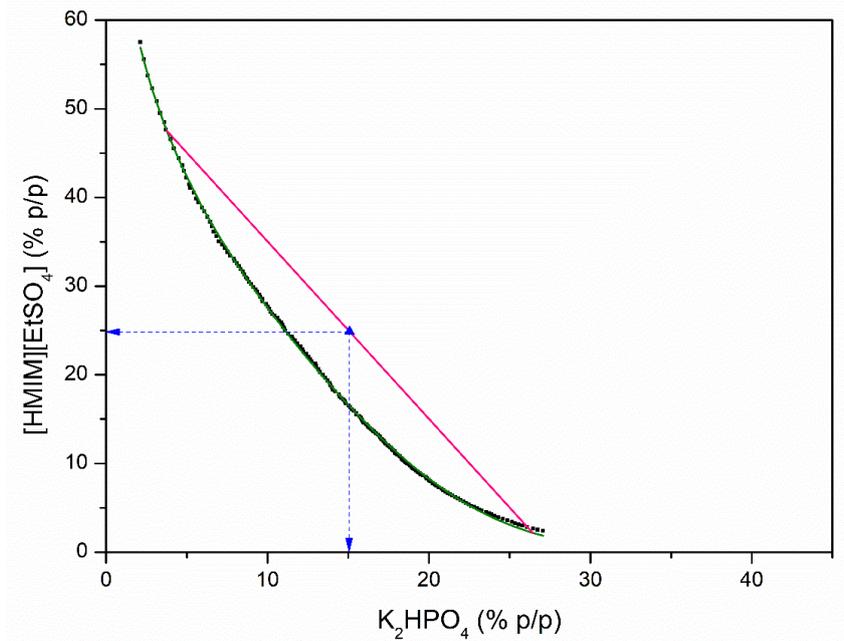


Figura 72. Curva binodal de equilibrio sal-LI-agua para el LI [HMIM][EtSO₄] y la sal K₂HPO₄. Los puntos negros (■) son los datos experimentales de la curva binodal, la línea verde es el ajuste a la ecuación de Merchuk, la línea rosa es la *tie-line* o recta de reparto y el triángulo azul (▲) es el punto medio de la *tie-line*, donde el volumen de la fase superior es igual al de la fase inferior ($V_{\text{TOP}} = V_{\text{BOTTOM}}$).

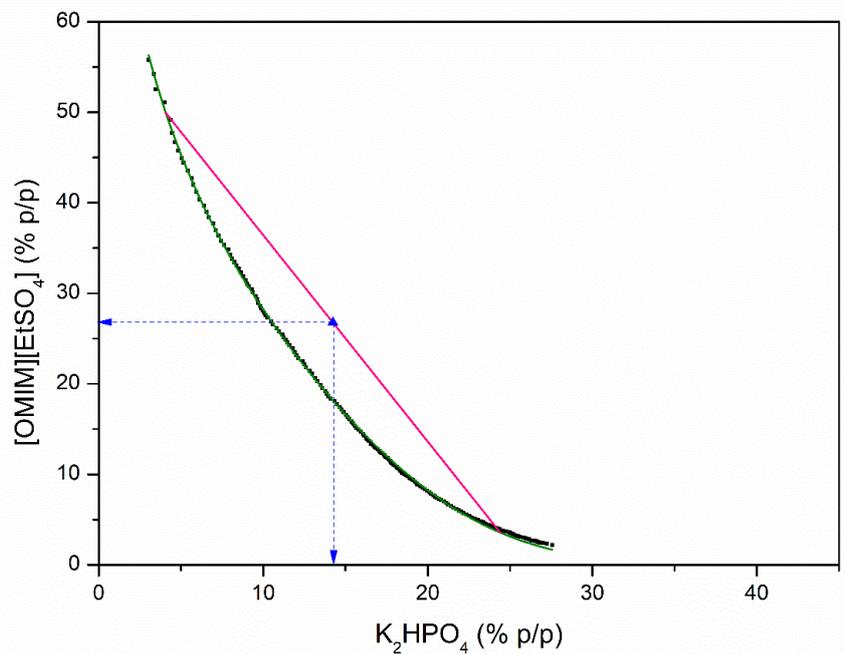


Figura 73. Curva binodal de equilibrio sal-LI-agua para el LI [OMIM][EtSO₄] y la sal K₂HPO₄. Los puntos negros (■) son los datos experimentales de la curva binodal, la línea verde es el ajuste a la ecuación de Merchuk, la línea rosa es la *tie-line* o recta de reparto y el triángulo azul (▲) es el punto medio de la *tie-line*, donde el volumen de la fase superior es igual al de la fase inferior ($V_{\text{TOP}} = V_{\text{BOTTOM}}$).

Para todos los sistemas ATPS descritos en las figuras 71, 72 y 73 que corresponden a los ATPS formados por los LIs [BMIM][EtSO₄], [HMIM][EtSO₄] y [OMIM][EtSO₄] el valor de R^2

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

asociado al ajuste al modelo de Merchuk ha sido completamente satisfactorio, obteniendo unos valores de R^2 mayores de 0,999 (tabla 19). En la tabla 19 también se muestran los parámetros de ajuste de la ecuación de Merchuk (A, B y C) para cada uno de los sistemas ATPS estudiados.

Tabla 19. Parámetros de ajuste de la ecuación de Merchuk: A, B, C y R^2 .

Líquidos iónicos en los sistemas bifásicos estudiados	Parámetros de ajuste a la ecuación de Merchuk			
	A	B	C	R^2
[EMIM][EtSO ₄]	85,29	-0,32	4,12E-05	0,99978
[BMIM][Cl]	91,94	-0,41	1,95E-05	0,99944
[BMIM][MeSO ₄]	84,13	-0,31	4,76E-05	0,99994
[BMIM][EtSO ₄]	98,50	-0,37	4,96E-05	0,99929
[HMIM][EtSO ₄]	96,75	-0,36	1,04E-04	0,99971
[OMIM][EtSO ₄]	117,03	-0,42	9,76E-05	0,99963

4.4.1. Estudio del efecto del pH

Como se ha mencionado anteriormente, la ficocianina es estable en un rango de pH entre 6,5-7. Por este motivo, antes de añadir el extracto crudo de PC al sistema ATPS, el pH del sistema se ajustó a 6,5-7 mediante la adición de HCl. En la figura 74 se muestran las recuperaciones de las diferentes ficobiliproteínas en cada uno de los sistemas ATPS formados con distintos LIs, comparando las recuperaciones de las ficobiliproteínas en sistemas ATPS sin regulación de pH y en sistemas en los que sí se ajustó el pH.

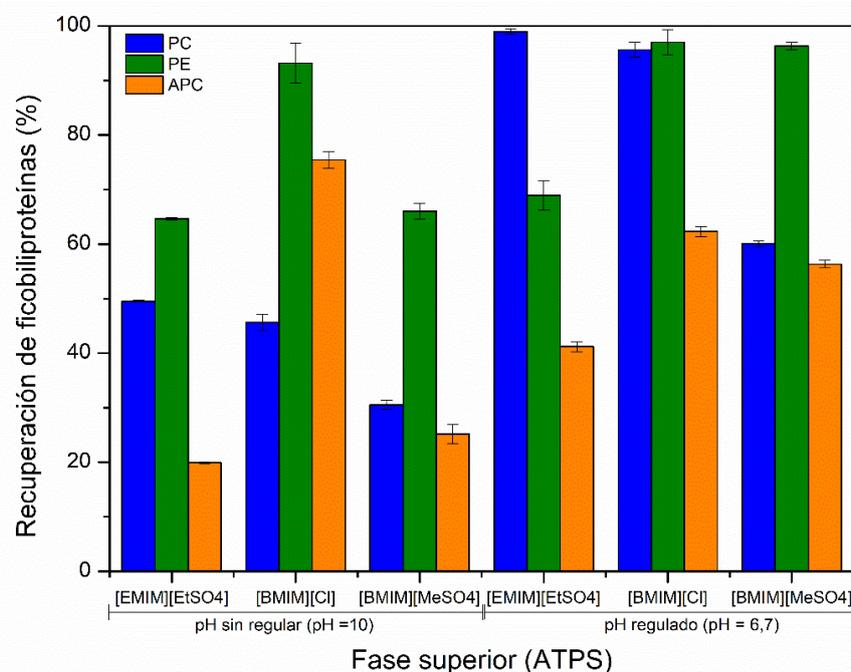


Figura 74. Recuperación de ficobiliproteínas (PC: ficocianina, PE: ficoeritrina, APC: aloficocianina) en la fase superior del ATPS formada por los LIs [EMIM][EtSO₄], [BMIM][MeSO₄] y [BMIM][Cl].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, tal y como se muestra en la figura 74, para el sistema bifásico acuoso en el que el pH de la fase superior ha sido ajustado a 6,7 se han obtenido mayores recuperaciones para todas las ficobiliproteínas. Concretamente, para el caso de la ficocianina se obtuvieron recuperaciones de los sistemas ATPS formados por [EMIM][EtSO₄], [BMIM][Cl] y [BMIM][MeSO₄] sin regular el pH de $49,5 \pm 0,1\%$, $45,6 \pm 1,5\%$ y $30,5 \pm 0,9\%$, respectivamente; frente a recuperaciones del $98,9 \pm 0,5\%$, $95,6 \pm 1,3\%$ y $60,1 \pm 0,5\%$, respectivamente con un sistema ATPS con pH ajustado. Aunque la ficoeritrina y la aloficocianina no son el objetivo principal del presente trabajo, en la figura 74 también se evaluó el efecto del pH en su recuperación en los diferentes sistemas ATPS. Para los ATPS formados por los LI [EMIM][EtSO₄] y [BMIM][MeSO₄] se obtuvieron mayores recuperaciones de ambas ficobiliproteínas al ajustar el pH (PE: $68,9 \pm 2,7\%$ y $96,3 \pm 0,7\%$; APC: $41,2 \pm 0,9\%$ y $56,3 \pm 0,7\%$, respectivamente) con respecto al sistema ATPS sin pH regulado (PE: $64,7 \pm 0,2\%$ y $66,0 \pm 1,5\%$; APC: $19,9 \pm 0,2\%$ y $25,1 \pm 1,8\%$, respectivamente). Por el contrario, para el [BMIM][Cl] las recuperaciones de ambas ficobiliproteínas no mejoraron al presentar un sistema ATPS con pH ajustado con respecto a uno sin regular.

Paralelamente, se ha analizado el efecto del pH sobre la pureza de las ficobiliproteínas recuperadas en la fase superior de los sistemas ATPS, tanto en los que no se ha ajustado el pH como en aquellos en los que sí se ha hecho (figura 75).

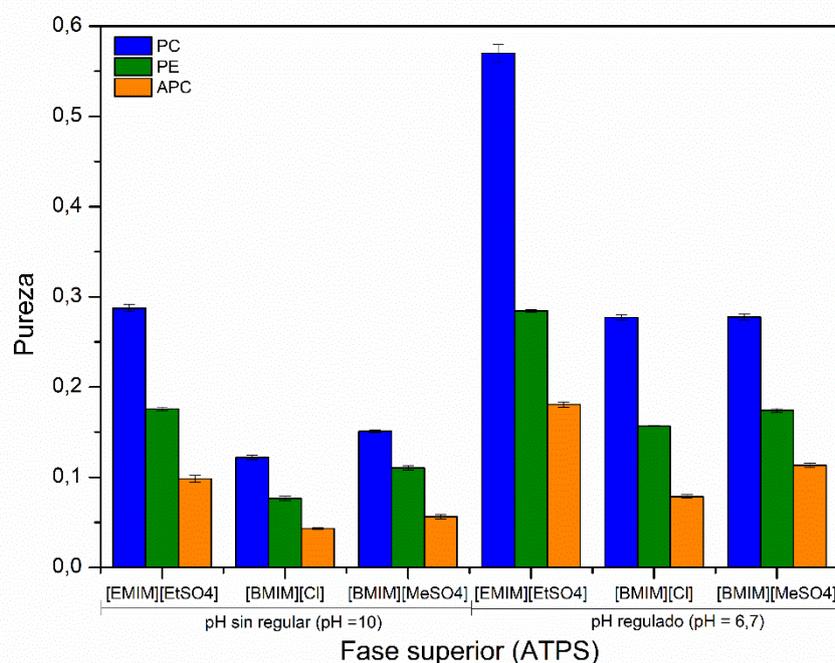


Figura 75. Pureza de las ficobiliproteínas recuperadas en la fase superior del ATPS formada por los LIs [EMIM][EtSO₄], [BMIM][MeSO₄] y [BMIM][Cl].

Prácticamente ninguno de los LIs utilizados consiguieron aumentar la pureza de la PC de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

forma significativa en los sistemas ATPS propuestos con respecto a la pureza del extracto de PC que se obtenía ($P_{PC} = 0,54$). Cabe destacar que, al igual que se ha comentado con las recuperaciones, en los sistemas de dos fases acuosas en los que el pH ha sido ajustado a 6,7 se han obtenido mayores purezas para cada una de las ficobiliproteínas y para cada uno de los sistemas ATPS correspondientes. El LI con el que se han conseguido mayores purezas para las tres ficobiliproteínas, y, sobre todo, para la ficocianina fue el [EMIM][EtSO₄], concretamente, P_{PC} en sistemas ATPS con pH sin regular ($0,290 \pm 0,003$) con respecto a sistemas ATPS con pH ajustado ($0,57 \pm 0,01$), P_{PE} en sistemas ATPS con pH sin regular ($0,180 \pm 0,002$) con respecto a sistemas ATPS con pH ajustado ($0,28 \pm 0,01$) y P_{APC} en sistemas ATPS con pH sin regular ($0,100 \pm 0,003$) con respecto a sistemas ATPS con pH ajustado ($0,180 \pm 0,003$). Cabe destacar que las purezas de PE y APC obtenidas mediante el sistema ATPS con pH ajustado con el [EMIM][EtSO₄] son menores que las que se obtuvieron en el extracto crudo de PC. Con respecto a los otros dos LIs de estudio ([BMIM][Cl] y [BMIM][MeSO₄]) no se consiguió aumentar la pureza de ninguna ficobiliproteína, con respecto a la que se obtuvo en el extracto crudo de PC, obteniendo valores comprendidos entre 0,07-0,27.

De igual forma que para la extracción, esto fue debido a que los LIs que tiene las cadenas alquílicas del catión más largas ([BMIM][MeSO₄] y [BMIM][Cl]) son más hidrofóbicos mientras que el LI con cadena alquílica más corta es más hidrofílico ([EMIM][EtSO₄]) y, por tanto, más afín a las ficobiliproteínas [195].

Como el [EMIM][EtSO₄] fue el LI que forma parte del sistema ATPS con el que se ha conseguido una mayor recuperación y pureza de PC, será el sistema bifásico elegido para separar la ficocianina de los carbohidratos.

Como conclusión, resulta imprescindible para todos los experimentos que impliquen la utilización de estos sistemas bifásicos la regulación del pH, previamente a la adición del extracto de PC del cual se quiera separar la misma.

4.4.2. Estudio del efecto del catión del líquido iónico

Como se ha podido comprobar, tanto en el proceso de extracción como en el sistema de dos fases acuosas (ATPS), el [EMIM][EtSO₄] fue el LI con el que se han obtenido mejores resultados tanto en la extracción como en la recuperación y pureza de PC con respecto a otros LIs estudiados: [BMIM][MeSO₄] y [BMIM][Cl]. Los líquidos iónicos con cadena alquílica más larga son más hidrofóbicos y, por tanto, menos afines a la superficie de estas ficobiliproteínas, aunque parece que las interacciones hidrofóbicas entre los grupos hidrofóbicos de la PC y las cadenas alquílicas del LI tienen un efecto significativo en la eficacia de su extracción y reparto en el sistema ATPS [219]. Por ello, para el presente trabajo, se ha analizado el efecto de la cadena alquílica del catión en la pureza de PC en el sistema ATPS con los LIs [BMIM][EtSO₄],

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

[HMIM][EtSO₄] y [OMIM][EtSO₄].

Los resultados de recuperación y pureza de PC obtenidos para el [EMIM][EtSO₄] en un sistema ATPS con pH regulado se mostraron con anterioridad en las figuras 74 y 75. Con respecto a la pureza y al factor de purificación en dicha etapa ($0,57 \pm 0,01$ y $1,07 \pm 0,01$, respectivamente) cabe destacar que ha aumentado ligeramente, pero se pudo comprobar que la PC en esta etapa no se ha purificado, como se explica más detalladamente en el apartado 4.5.2. Los resultados obtenidos en el sistema ATPS con los distintos LIs de cadena alquílica más larga se muestran a continuación:

Tabla 20. Rendimiento de extracción (E_{PC}), recuperación, pureza (P_{PC}) y factor de purificación (PF) de PC para el LI [BMIM][EtSO₄].

Etapa	E_{PC} (mg/g)	Recuperación PC (%)	P_{PC}	PF
Extracto crudo de PC	$76,5 \pm 0,3$	-	$0,53 \pm 0,02$	-
Diálisis	$75,8 \pm 0,2$	$99,0 \pm 1,2$	$1,01 \pm 0,06$	$1,9 \pm 0,1$
Fase superior (ATPS)	$17,2 \pm 1,8$	$22,5 \pm 1,3$	$0,340 \pm 0,001$	$0,63 \pm 0,02$

Tabla 21. Rendimiento de extracción (E_{PC}), recuperación, pureza (P_{PC}) y factor de purificación (PF) de PC para el LI [HMIM][EtSO₄].

Etapa	E_{PC} (mg/g)	Recuperación PC (%)	P_{PC}	PF
Extracto crudo de PC	$76,5 \pm 0,3$	-	$0,48 \pm 0,03$	-
Diálisis	$76,1 \pm 0,3$	$99,5 \pm 0,4$	$1,07 \pm 0,01$	$2,21 \pm 0,02$
Fase superior (ATPS)	$9,0 \pm 0,3$	$11,8 \pm 0,4$	$0,180 \pm 0,002$	$0,36 \pm 0,04$

Tabla 22. Rendimiento de extracción (E_{PC}), recuperación, pureza (P_{PC}) y factor de purificación (PF) de PC para el LI [OMIM][EtSO₄].

Etapa	E_{PC} (mg/g)	Recuperación PC (%)	P_{PC}	PF
Extracto crudo de PC	$74,5 \pm 0,3$	-	$0,46 \pm 0,05$	-
Diálisis	$76,7 \pm 1,0$	$101,7 \pm 1,7$	$0,92 \pm 0,01$	$2,00 \pm 0,03$
Fase superior (ATPS)	$10,5 \pm 0,6$	$13,9 \pm 0,7$	$0,210 \pm 0,003$	$0,47 \pm 0,01$

En los tres sistemas de purificación mediante ATPS, basados en los LIs [BMIM][EtSO₄], [HMIM][EtSO₄] y [OMIM][EtSO₄] (tablas 20, 21 y 22, respectivamente) fue necesaria una etapa previa de diálisis para separar el LI empleado en la etapa de extracción [EMIM][EtSO₄], ya que este era diferente al usado en el sistema ATPS correspondiente. La recuperación de PC en la etapa de ATPS de todos ellos disminuyó drásticamente ($22,5 \pm 1,3\%$, $11,8 \pm 0,4\%$ y $13,9 \pm 0,7\%$) junto con la pureza de PC ($0,340 \pm 0,001$, $0,180 \pm 0,002$ y $0,210 \pm 0,003$). Esto también se puede apreciar visualmente en la siguiente figura ya descrita previamente en la metodología:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Figura 49. Efecto de la cadena alquílica del catión en la separación y purificación de ficocianina. *Mostrada en metodología.*

Tal y como se aprecia en la figura 49 la PC se ha concentrado preferentemente en la fase superior de todos los sistemas ATPS, sin embargo, el brillo y la tonalidad de la misma se aprecian diferentes conforme aumenta la cadena alquílica del catión (menos azulada y brillante) lo que está en consonancia con los datos mostrados en las tablas anteriores (tablas 20-22).

Las bajas recuperaciones, purezas y cambio de tonalidad de PC (de azul a morado) para los LIs de cadena alquílica mayor indican un posible cambio o alteración en la ficocianobilina (PCB), que es el cromóforo de la PC. Una de las posibles razones por las que se podría producir dicha alteración es por cambios de pH, pero se comprobó de forma experimental que todos los valores de pH de los distintos sistemas ATPS estaban entre 6,5-7, lo que no generaría cambios en la ficocianobilina. Para comprobar el estado del cromóforo se hicieron medidas de fluorescencia.

❖ Análisis de fluorescencia

Debido a los resultados de baja recuperación y pureza de PC obtenidos en la fase superior de los sistemas ATPS para los LIs de estudio: [BMIM][EtSO₄], [HMIM][EtSO₄] y [OMIM][EtSO₄] se quiso comprobar si el aumento de la longitud de la cadena alquílica del catión afectaba de alguna forma a la ficocianobilina. Por ese motivo se ha evaluado la fluorescencia de la PC en dichas fases ya que la PC es una ficobiliproteína fluorescente. Por ello, se analizaron los correspondientes espectros de emisión en fluorescencia, tal y como se muestra en la figura 76.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

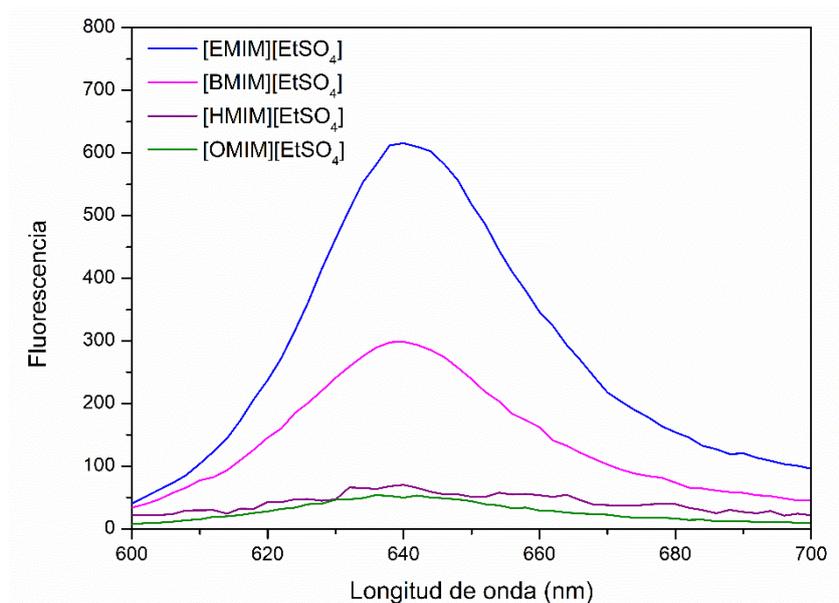


Figura 76. Espectro de emisión de PC en la fase superior del sistema ATPS para los distintos LIs de estudio. La excitación se realizó a 620 nm y el espectro de emisión se registra en el intervalo de 600 a 700 nm. Todos los espectros se midieron a temperatura ambiente.

Como se puede observar en el espectro de fluorescencia de la figura 76, según aumenta la longitud de la cadena alquílica del catión (C2 en MIMEtSO₄ → C8 en MIMEtSO₄) la intensidad de la emisión disminuye. Por ello, el cromóforo estaba siendo afectado por ese cambio en la cadena alquílica. Sin embargo, esta disminución en la fluorescencia también pudo deberse a la disminución en la cantidad de PC tal y como mostraban las tablas 20-22. Por ese motivo se analizaron también los respectivos espectros de absorción UV-Vis para cada una de estas fases superiores de PC correspondientes a los distintos LIs empleados (figura 77).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

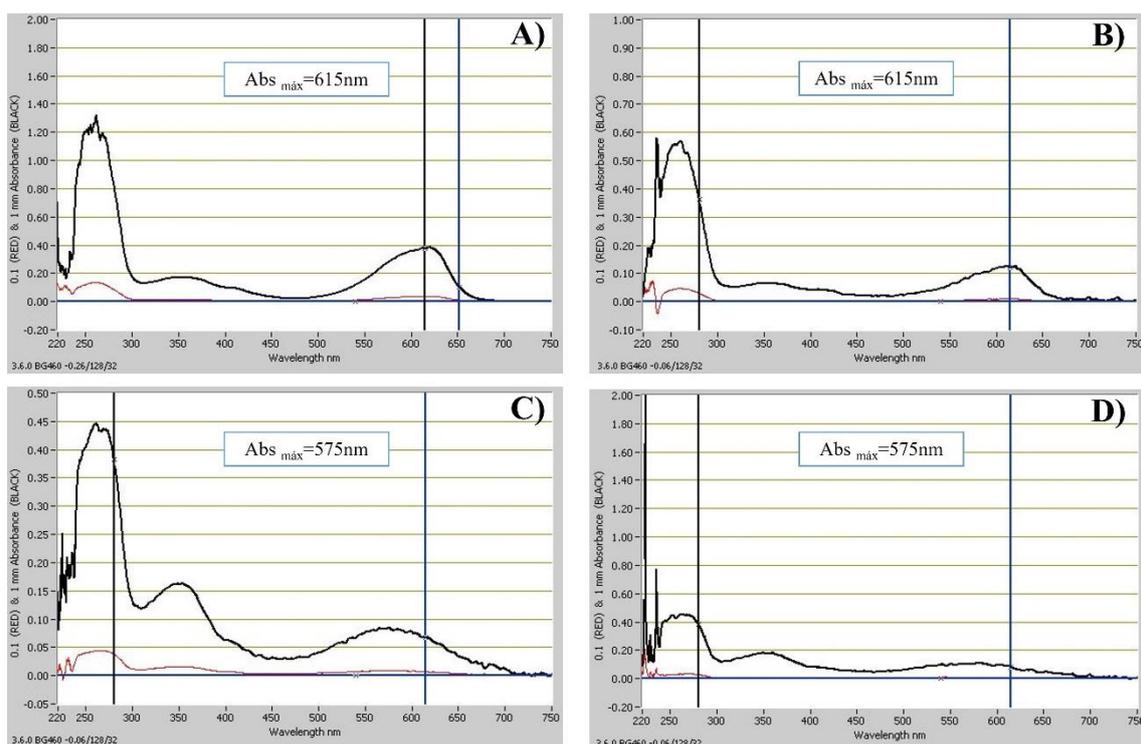


Figura 77. Espectro de absorción UV-Vis de la PC en la fase superior del sistema ATPS con [EMIM][EtSO₄] (A), [BMIM][EtSO₄] (B), [HMIM][EtSO₄] (C) y [OMIM][EtSO₄] (D).

Como se puede ver en el espectro de UV-Vis (A) correspondiente a la fase superior del ATPS con el LI [EMIM][EtSO₄], el máximo de absorción se encuentra próximo a 615 nm, es decir, donde se encuentra el pico característico de la PC tal y como se muestra en la figura 78.

Sin embargo, aunque en el espectro UV-Vis obtenido para el LI [BMIM][EtSO₄] (B) se sigue observando el máximo a 615 nm, se aprecia una gran disminución en la intensidad de absorbancia a esa longitud de onda, lo cual implica una disminución de la cantidad de PC, lo cual está en concordancia con los resultados de la tabla 20.

Por último, prestando atención a los espectros UV-Vis (C) y (D) por un lado, también presentan una gran caída en la intensidad de absorción a 615 nm y, además, se aprecia como el máximo de absorción ha cambiado a 575 nm. Dicho máximo de absorción (575 nm) coincide con un isómero de la ficocianobilina, la ficoviolobilina (PVB). Lo que genera una segunda posibilidad de lo que puede estar pasando con el cromóforo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

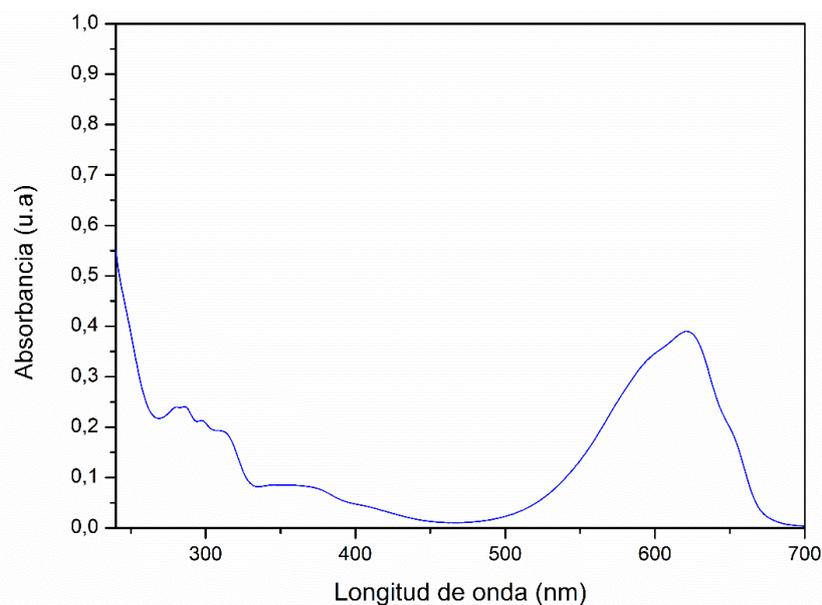


Figura 78. Espectro de absorción UV-Vis de la ficocianina pura.

Por lo tanto, considerando tanto los cambios de color observados en la fase superior del ATPS para los LIs de cadenas alquilo largas (cambio a tonalidad morada) como los cambios observados en el máximo de absorción en los espectros UV-Vis (figura 77) resulta prácticamente evidente que el cromóforo de la PC (ficocianobilina) ha cambiado.

En primer lugar, Chen y colaboradores [418] estudiaron previamente que en algunas especies de microalgas uno o dos cromóforos periféricos (α -84 PCB y/o β -155 PCB) de PC se pueden sustituir por otros cromóforos como la ficoviolobilina (PVB), la ficoeritrobilina (PEB) o la ficourobilina (PUB), para su adaptación a ciertas condiciones ambientales. Y, a su vez, Hardman y colaboradores [419] detectaron la autoisomerización del cromóforo de PC, ficocianobilina (PCB) a PVB (figura 79), o, lo que es lo mismo, el cambio de color azul a morado, con lo que existe la posibilidad de que esto sea lo que ha sucedido en el presente trabajo.

La ficoviolobilina (PVB) es un tipo de ficobilina que está presente en otro tipo de ficobiliproteína menos relevante como es la ficoeritrocianina, este tipo de ficobiliproteína es captadora de luz de color magenta y participa también la fotosíntesis de algunas cianobacterias. Dicha ficobiliproteína consta de dos subunidades alfa y beta, agregadas formando un hexámero, que contiene pigmentos de tipo ficobilina, que pueden ser violetas, correspondientes al cromóforo ficoviolobilina o dos ficocianobilinas azules.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

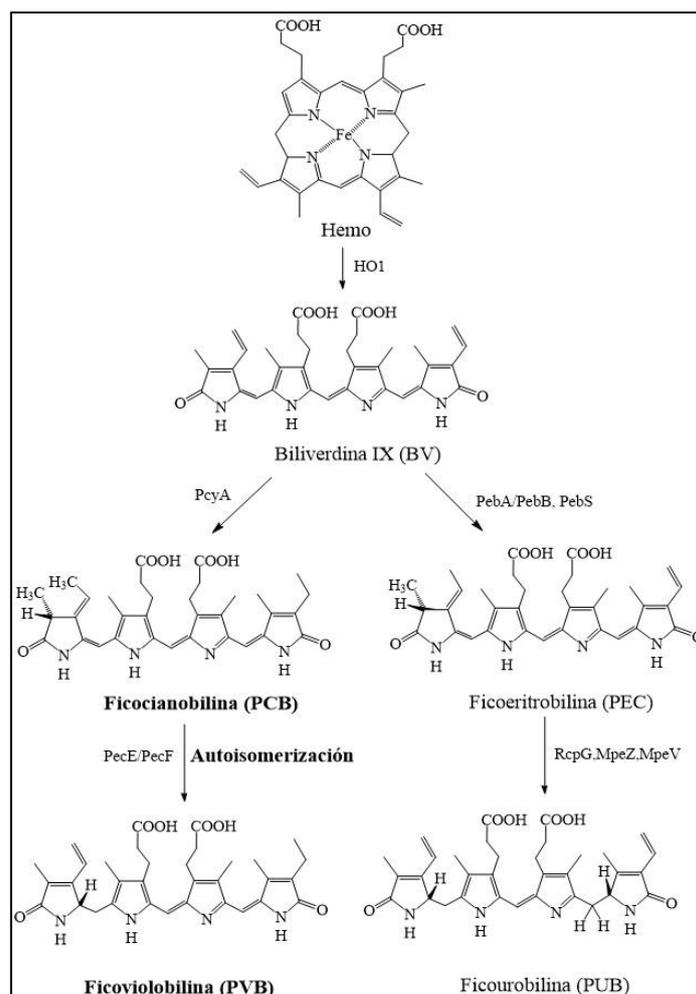


Figura 79. Biosíntesis de las ficobilinas en cianobacterias. Modificado de Chen y colaboradores [418]

En la figura 79 se ha explicado la biosíntesis de la ficocianobilina (cromóforo de la ficocianina) siendo el principal precursor de las ficobilinas la biliverdina IX, que a su vez es el producto resultante de la acción de la enzima hemo oxigenasa. La unión de los cromóforos a las ficobiliproteínas se basa en modificaciones postraduccionales en las que intervienen enzimas liasas específicas. Estas enzimas aseguran la unión de la bilina al residuo de cisteína correspondiente. Y, por último, se muestra la interconversión por autoisomerización de PCB a PVB [419].

En segundo lugar, otra explicación de lo que puede estar sucediendo es que, aunque los cationes del LI influyen menos en la estabilidad de las proteínas que los aniones; aun así, influyen de manera significativa. En un estudio realizado por Silva y colaboradores [420] se demostró que las cadenas de alquilo más largas de los LIs basados en imidazolio (LIs más hidrofóbicos) están asociados con un mayor efecto de desestabilización en proteínas que los grupos alquilo cortos (menos hidrofóbicos). La razón de tal desestabilización radica en el aumento de la superficie de contacto del catión con la proteína, particularmente en los contactos hidrofóbicos promovidos por el extremo de la cadena alquílica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la herramienta STD-NMR determinaron qué átomos de hidrógeno del catión del LI interaccionan más fuertemente con la proteína. Para LIs de cadena corta ([C2MIM]⁺) la interacción se localizaba predominantemente en el núcleo del anillo aromático de imidazol, lo que significaba que la principal fuerza impulsora de la interacción proteína-catión era de *naturaleza electrostática*. Sin embargo, los resultados obtenidos para LIs de cadena alquílica mayor ([C4MIM]⁺) mostraron que, además de tener como fuerza impulsora de la interacción proteína-catión interacciones electrostáticas, las *interacciones hidrofóbicas* también eran importantes. Por ello hay que prestar especial atención al carácter hidrofóbico de los aminoácidos presentes en la superficie externa de la PC. Por ese motivo, para comprobar la hipótesis de la *interacción hidrofóbica* proteína-catión, en la figura 80 se ha coloreado la superficie externa, expuesta al disolvente (en el caso de la presente tesis el LI), del hexámero de PC de acuerdo con la escala normalizada de hidrofobicidad de Eisenberg [421] (tabla 23), de forma que una mayor intensidad de color rojo se correlaciona con un mayor carácter hidrófobo de los aminoácidos.

Tabla 23. Escala normalizada de Eisenberg de hidrofobicidad de aminoácidos

Escala normalizada de hidrofobicidad	
Ile:1,38	Pro: 0,12
Phe:1,19	Thr: -0,05
Val:1,08	Ser: -0,18
Leu:1,06	His: -0,40
Trp:0,81	Glu: -0,74
Met: 0,64	Asn: -0,78
Ala: 0,62	Gln:-0,85
Gly: 0,48	Asp: -0,90
Cys: 0,29	Lys: -1,50
Tyr: 0,26	Arg: -2,53

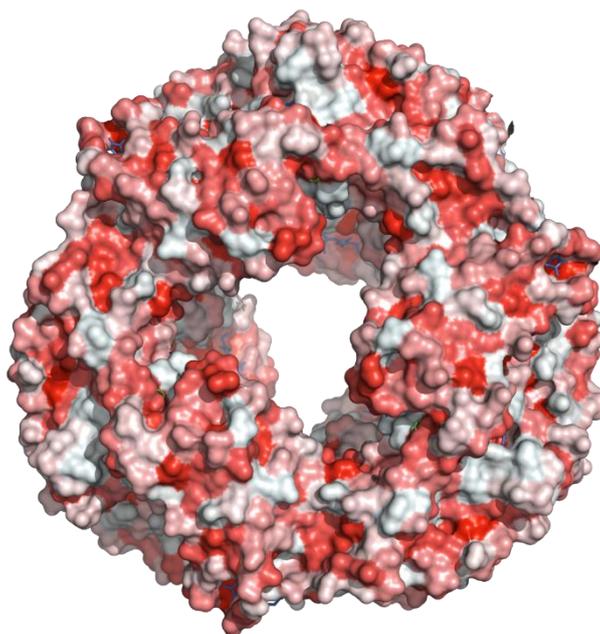


Figura 80. Superficie externa del hexámero (α/β)₆ de PC, coloreados según la escala de hidrofobicidad normalizada de Eisenberg. Mostrado en la figura 11 (ver *apartado 1.2.2*).

La representación anterior se ha realizado a partir de la secuencia 1HA7 (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>) empleando el programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.4. Schrödinger, LLC. Nueva York, NY, EE.UU.). Para la representación de colores de la superficie hidrofóbica del hexámero se ha empleado también el programa, escrito en Python, “color_h.py” (https://pymolwiki.org/index.php/Color_h), encargado de transformar la escala numérica de hidrofobicidad de Eisenberg en la correspondiente escala de colores.

Tal y como se observa en la figura 80 se han representado los aminoácidos de la superficie externa del hexámero de la PC coloreados según su hidrofobicidad, en la que se confirmó que, efectivamente había muchas zonas hidrófobas, tal y como también publicaron Mohamed y colaboradores [422]. Por ese motivo, al utilizar LI más largos (más hidrófobos) aumentaba la superficie de contacto entre la proteína y el catión del LI de cadena larga, y, por ende, la desestabilización de la PC.

Por ello, un LI con cadenas alquílicas más largas es capaz de interactuar con la proteína de forma electrostática (al igual que lo haría un LI de cadena corta) y de forma hidrofóbica, por lo que es un desestabilizador más potente; ya que puede ocasionar un mayor daño conformacional a la estructura terciaria de la PC. Se cree que el LI puede ser capaz de distorsionar los enlaces de la estructura terciaria y esto causaría una disminución en la intensidad del máximo visible en el espectro de UV-Vis tal y como se ha visto en la figura 77 y afectará igualmente de forma significativa a la fluorescencia, tal y como se ha apreciado en la figura 76.

De igual manera, la disminución de la intensidad del máximo visible en el espectro de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

UV-Vis ha sido explicada en bibliografía como una desnaturalización de la ficocianina, normalmente mediante calor, urea, digestión proteolítica y acidificación [423]. Sin embargo, relacionando este resultado con el trabajo anterior de Silva y colaboradores [420], se puede observar que la desestabilización de la proteína ocasionada por LIs de cadenas alquílicas más largas ocasiona la disrupción del entorno proteico, que es de suma importancia para la geometría del cromóforo. Estos cambios en la conformación del cromóforo dan como resultado diferentes formas del sistema π -electrónico y, en consecuencia, diferentes espectros de absorción, tal y como sucedió en la presente tesis doctoral. Cuando la ficocianina se encuentra en estado nativa, el esqueleto de la proteína mantiene a los cromóforos en una conformación estrechamente extendida que maximiza la absorbancia en la región visible. Sin embargo, tras la desnaturalización de la misma, las interacciones cromóforo-proteína se destruyen o se debilitan de forma que los cromóforos son más flexibles, y, aunque siguen unidos a las proteínas, tienen a enrollarse en una conformación más plegada.

Para concluir, a partir de los resultados obtenidos, se ha seleccionado el [EMIM][EtSO₄] como el LI utilizado en la presente tesis doctoral tanto para la extracción de PC como para el sistema ATPS. Por lo que, una vez obtenido el extracto de PC, esta ficobiliproteína se ha purificado mediante dos enfoques diferentes (*apartado 4.5*).

4.5. Purificación de ficocianina

Tal y como se mencionó en el *apartado 3.1.2*, la separación y purificación de ficocianina se ha llevado a cabo mediante dos vías: (1) diálisis + precipitación con sulfato de amonio y (2) sistema de bifásico acuoso (ATPS) + diálisis + precipitación con sulfato de amonio. Ambos esquemas se describieron con anterioridad en la figura 44 del apartado de metodología.

4.5.1. Método de purificación 1: diálisis + precipitación

Los resultados obtenidos de la purificación del extracto crudo de ficocianina mediante la primera vía: (1) diálisis + precipitación con sulfato de amonio se muestran en la tabla 24:

Tabla 24. Rendimiento de extracción (E_{PC}), recuperación, pureza (P_{PC}) y factor de purificación (PF) de PC para el método de purificación 1 (diálisis + precipitación).

Etapa	E_{PC} (mg/g)	Recuperación PC (%)	P_{PC}	PF
Extracto crudo de PC	76,6 ± 0,4	-	0,54 ± 0,01	-
Diálisis	67,7 ± 0,9	88,4 ± 1,5	0,85 ± 0,03	1,57 ± 0,05
Precipitación*	48,9 ± 0,9	63,9 ± 0,9	3,5 ± 0,1	6,4 ± 0,2

*Precipitado correspondiente a la 2ª precipitación (50% de saturación de sulfato de amonio)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la tabla 24, en este primer enfoque de purificación, el rendimiento de extracción disminuyó en las etapas de diálisis y precipitación ($67,7 \pm 0,9$ y $48,9 \pm 0,9$ mg/g, respectivamente) en comparación con el valor correspondiente al extracto crudo de ficocianina ($76,6 \pm 0,4$ mg/g). Esto fue debido a las correspondientes pérdidas de PC en cada paso de purificación. Por ese motivo las recuperaciones tras la diálisis y la precipitación fueron del $88,4 \pm 1,5$ y del $63,9 \pm 0,9$ %, y las pérdidas de extracto de PC del $11,6$ % y el $36,2$ %, respectivamente.

Con respecto a la pureza de PC (P_{PC}), ésta mejoró en comparación con la del extracto crudo de PC ($0,54 \pm 0,01$), alcanzando valores de $0,85 \pm 0,03$ (tras la diálisis) y $3,5 \pm 0,1$ (tras la precipitación), correspondientes al grado 1 (0,7-1,5) y grado 3 (2,5-3,5), que la hacen apta para uso en la industria alimentaria y como biomarcador en aplicaciones biomédicas, respectivamente.

De igual forma, estos resultados son análogos al grado de pureza evaluado a través del factor de purificación (PF): $1,57 \pm 0,05$ (diálisis) y $6,4 \pm 0,2$ (precipitación). Con respecto al último valor, significó que la pureza aumentó seis veces con respecto a la del extracto crudo. Todo ello demuestra la idoneidad del proceso de extracción basado en LI con este procedimiento de purificación.

Además, la pureza de PC (P_{PC}) obtenida a través del método de purificación (1) del presente trabajo fue significativamente superior a los valores publicados previamente por otros autores [424–428]. Valores de pureza de PC de 3,25 y 3,74, similares a los obtenidos en el presente trabajo, se han obtenido utilizando etapas de purificación adicionales basadas en cromatografía en uno y/o dos pasos, respectivamente [225]. En otros trabajos, para alcanzar dichas purezas, las recuperaciones de PC fueron significativamente inferiores (48% y 22%, respectivamente) a la del presente trabajo ($63,9 \pm 0,9\%$), ya que una de las desventajas frecuentes de utilizar técnicas cromatográficas para purificar PC son las bajas recuperaciones obtenidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.2. Método de purificación 2: ATPS + diálisis + precipitación

Para este caso, en el sistema ATPS se ha utilizado el LI seleccionado previamente, el [EMIM][EtSO₄], ya que fue el que ha mostrado los mejores resultados tanto para extracción como para ATPS. Los resultados obtenidos de la purificación del extracto crudo de ficocianina mediante ATPS + diálisis + precipitación con sulfato de amonio se muestran en la tabla 25:

Tabla 25. Rendimiento de extracción (E_{PC}), recuperación, pureza (P_{PC}) y factor de purificación (PF) de PC para el método de purificación 2 (ATPS + diálisis + precipitación) con el LI [EMIM][EtSO₄].

Etapa	E _{PC} (mg/g)	Recuperación PC (%)	P _{PC}	PF
Extracto crudo de PC	76,6 ± 0,4	-	0,54 ± 0,01	-
Fase superior (ATPS)	74,0 ± 0,2	96,7 ± 0,3	0,57 ± 0,01	1,07 ± 0,01
Diálisis	70,0 ± 0,4	91,3 ± 1,4	2,4 ± 0,3	4,5 ± 0,3
Precipitación*	46,0 ± 1,0	60,0 ± 1,1	4,22 ± 0,05	7,88 ± 0,06

*Precipitado correspondiente a la 2ª precipitación (50% de saturación de sulfato de amonio)

En este enfoque de purificación, el rendimiento de extracción (E_{PC}), disminuyó ligeramente después de las etapas de ATPS (74,0 ± 0,2 mg/g) y diálisis (70,0 ± 0,4 mg/g) con respecto al valor del extracto crudo de PC (76,6 ± 0,4 mg/g). Las pérdidas de PC fueron más notables después de la etapa de precipitación (46,0 ± 1,0 mg/g). Aun así, estos resultados muestran unas altas recuperaciones de PC utilizando el sistema ATPS (96,7 ± 0,3%) y la etapa de diálisis (91,3 ± 1,4%). Aunque se aprecie una recuperación menor en la etapa de precipitación (60,0 ± 1,1%), sigue siendo superior a las recuperaciones obtenidas en otros trabajos donde se realizaron pasos adicionales como la cromatografía de filtración en gel y la cromatografía de intercambio iónico [225,426].

Como se puede observar en las tablas 24 y 25, las recuperaciones finales de ambas vías de purificación de PC (diálisis + precipitación y ATPS + diálisis + precipitación) fueron muy similares (63,9 ± 0,9 % y 60,0 ± 1,1 %, respectivamente) con lo que la adición del paso adicional del sistema de dos fases acuosas no supone una disminución importante en términos de cantidad de ficocianina recuperada.

La pureza de PC (P_{PC}) obtenida tras el sistema ATPS fue ligeramente mayor (0,57 ± 0,01) que la pureza del extracto crudo (0,54 ± 0,01). Esto se puede explicar ya que el sistema ATPS extrae de forma selectiva las proteínas en la fase superior, debido a la afinidad de ellas por el LI, mientras que en este sistema los carbohidratos se fraccionan preferentemente en la fase inferior. Para comprobar esta hipótesis se analizaron la fase superior e inferior obtenidas en el sistema ATPS, mostrando que el 83% en peso de las proteínas totales se solubilizaron en la fase superior, mientras que el 38,6% en peso de los carbohidratos restantes se acumularon en la fase inferior. De esta forma, se demuestra que, aunque el ATPS no ha resultado muy eficaz en la purificación de ficocianina, sí que ha resultado ventajoso en la separación de carbohidratos de PC, y, de alguna

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

forma, la eliminación del 17% de proteínas totales, principalmente no ficobilproteínas, a la fase inferior hace que la pureza final alcanzada sea algo mayor en este enfoque.

La pureza de PC aumentó a $2,4 \pm 0,3$ y $4,22 \pm 0,05$ y el factor de purificación a $4,5 \pm 0,3$ y $7,88 \pm 0,06$ después de las etapas de diálisis y precipitación, respectivamente. Esto permitió concluir que mediante este método la pureza de la PC aumentó en hasta casi 8 veces con respecto al extracto crudo de PC. De modo que la pureza obtenida mediante este método de purificación (ATPS + diálisis + precipitación) alcanzó el grado analítico de pureza (>4), apto para fines farmacéuticos y nutracéuticos, siendo superior a la pureza final obtenida mediante el método de purificación visto en el *apartado 4.5.1* (diálisis + precipitación).

A modo comparativo se presenta la figura 81, donde se comparan los resultados de pureza de PC obtenidos en el presente trabajo mediante los métodos de purificación 1 y 2 con valores de pureza obtenidos en otros trabajos anteriores.

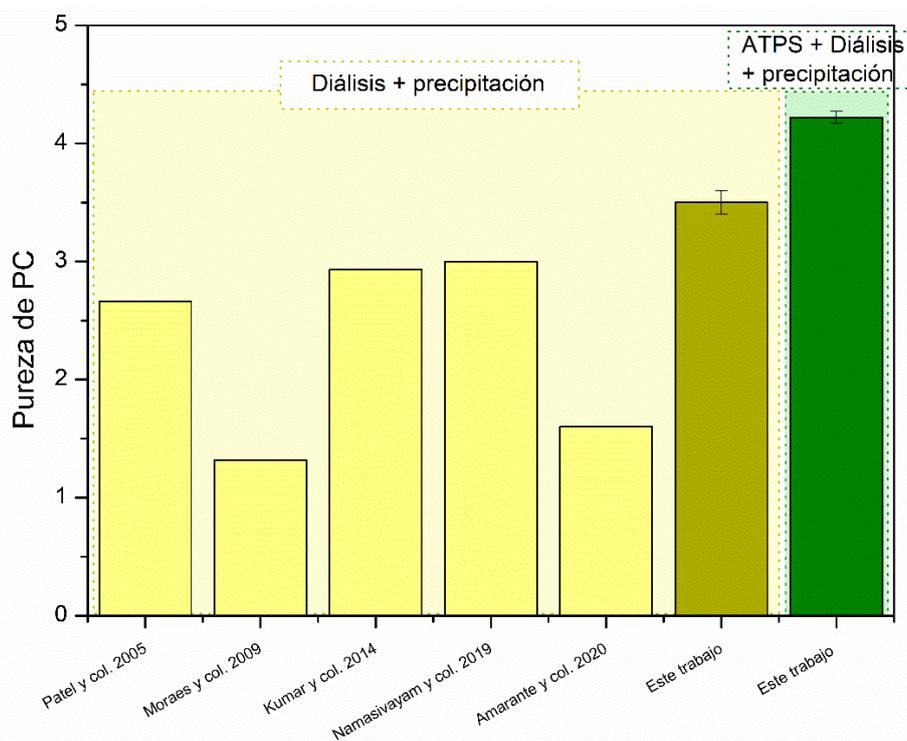


Figura 81. Gráfica comparativa entre la pureza de PC obtenida en otros trabajos frente a la pureza obtenida en el presente trabajo.

Como se puede observar en la figura 81, con respecto a la pureza obtenida mediante *diálisis + precipitación* se mejoraron los valores obtenidos bibliográficamente. Por ejemplo, Kumar y colaboradores [426] obtuvieron una pureza de 2,93, próxima a la obtenida en el actual trabajo ($3,5 \pm 0,1$), pero obtuvieron una recuperación de PC menor (aproximadamente del 39%).

Por otro lado, la pureza final obtenida en la presente tesis doctoral ($4,22 \pm 0,05$) mediante

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la adición de una etapa previa de purificación, como es el ATPS, resultó comparable con otros valores de pureza obtenidos en otros trabajos donde se emplearon procesos adicionales como la cromatografía de intercambio iónico, obteniéndose valores de purezas de PC de 4,42 [425] y 4,58 [426], y la ultrafiltración, con valores de pureza de 3,8 [428]. Sin embargo, estos aumentos en la pureza implican una menor recuperación de PC, 45,6%, 14%, 49,6%, respectivamente; que son notablemente inferiores al obtenido en el presente trabajo (60%).

Por todo lo mencionado anteriormente, es importante tener en cuenta que debe existir un equilibrio entre la pureza y la cantidad de PC recuperada al final del proceso de purificación.

Por ello, se ha seleccionado el segundo método de purificación (ATPS + diálisis + precipitación), ya que ha permitido alcanzar una pureza mayor con una adecuada recuperación final de PC (semejante al primer método de purificación). El contenido de ficocianina, proteínas totales, carbohidratos (CH) y lípidos se ha analizado en todas las fracciones obtenidas durante todo el proceso y se presenta a continuación en los balances de materia.

❖ Balances de materia

El reparto de los distintos componentes se ha planteado tanto por cada etapa del proceso (extracción mediante ultrasonidos, sistema de dos fases acuosas (ATPS), diálisis y precipitación con sulfato de amonio) como de forma global, donde se puede ver con más claridad. A continuación, se muestran los balances de cada etapa en las figuras 82, 83, 84 y 85.

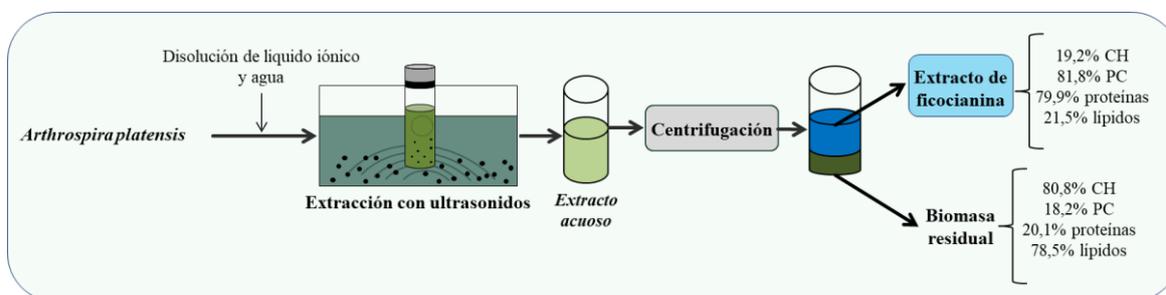


Figura 82. Balance de materia en el proceso de extracción. *Proteínas no incluye la PC.

Como se aprecia en la figura 82 la mayoría de las proteínas (tanto la PC como las proteínas totales) se han extraído en el extracto crudo de PC (81,8% y 79,9%, respectivamente). Sin embargo, tanto los lípidos como los carbohidratos se han concentrado preferentemente en la biomasa residual resultante tras la extracción de PC (78,5% y 80,8%, respectivamente), lo que resultó muy interesante de cara a su valorización energética a través del proceso de HTL y de digestión anaerobia.

A continuación, se plantea el reparto de los distintos componentes en el *sistema ATPS* (figura 83).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

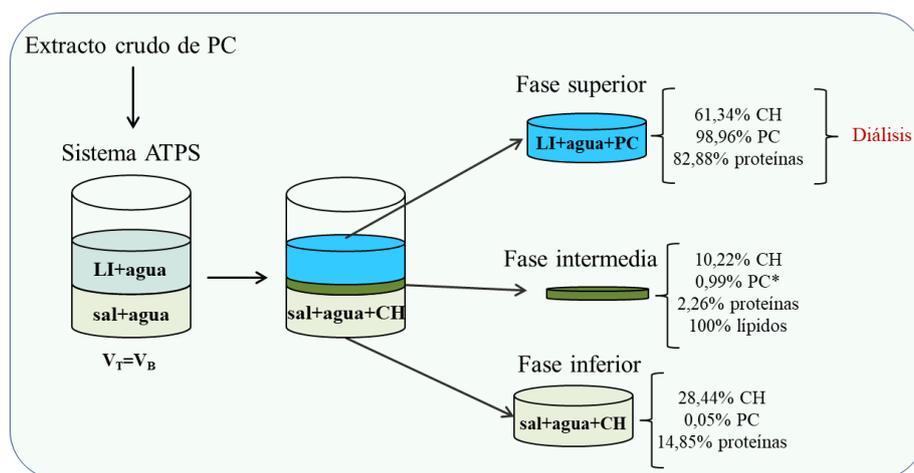


Figura 83. Balance de materia en el sistema ATPS. *Proteínas no incluye la PC.

Tal y como muestra la figura 83, la mayor parte de las proteínas totales (83%), incluyendo la PC (99%), se han concentrado preferentemente en la fase superior del sistema ATPS. Tanto la separación de ambas fases como el reparto de los distintos compuestos está condicionado por atracciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Por ello, las fuerzas impulsoras que, generalmente, permiten el reparto de las proteínas a la fase superior (preferentemente) son las interacciones electrostáticas entre los residuos de aminoácidos cargados negativamente en la superficie de la proteína y el catión del líquido iónico, cargado positivamente.

Como ya se mencionó previamente, el pH del sistema ATPS se ha ajustado a un valor de 7. Los dos motivos principales por los que fue necesario realizar el ajuste del pH fueron: en primer lugar, que la PC es estable a pH de 6,5-7 y, por otra parte, que el pH afectaba al reparto de esta biomolécula en el sistema ATPS. Cuando el pH del sistema es superior al punto isoelectrico de la proteína objetivo ($pI_{PC} = 4,1-4,3$), ésta se carga negativamente e interacciona con el catión del LI que está cargado positivamente. Por ese motivo, tanto la PC como el resto de las proteínas se han concentrado en la fase superior y por ello, la pureza de PC prácticamente no ha mejorado en esta etapa.

Sin embargo, los carbohidratos se han distribuido entre las distintas fases, de forma que, una parte de ellos se ha concentrado entre la fase intermedia y la fase inferior (39%), eliminándose de la fase superior enriquecida en ficobiliproteínas, con lo que el ATPS ha resultado ventajoso en la separación de los CH de las proteínas.

Con respecto a la fracción lipídica remanente en el extracto crudo de PC (21%) que se ha incorporado al sistema ATPS, cabe destacar que también se ha separado de las proteínas y de la PC, puesto que se ha concentrado preferentemente en una tercera fase intermedia, formada entre la fase superior y la inferior, como también han confirmado anteriormente Suarez Ruiz y colaboradores [429].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De esta forma, el sistema bifásico acuoso ha resultado muy útil ya que tanto una parte importante de los carbohidratos como la totalidad de los lípidos que acompañaban a la PC y a otras proteínas en el extracto inicial, han podido separarse de ellas sin afectar a la calidad de dichas proteínas.

Al igual que en las etapas anteriores, a continuación, se plantea el reparto para la *etapa de diálisis* (figura 84).

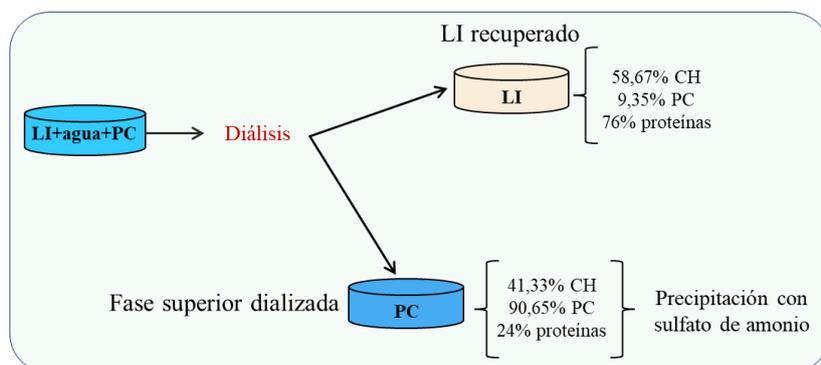


Figura 84. Balance de materia en el proceso de diálisis. *Proteínas no incluye la PC.

Relacionando los resultados de pureza de la tabla 25 obtenidos tras el proceso de diálisis con el reparto de proteínas observado en la figura 84, se justifica la relevancia que tiene el proceso de diálisis tanto en la purificación de PC, como en la recuperación del LI. Como se analizó en la tabla 25, la pureza de PC aumentó de 0,57 a 2,4 en el proceso de diálisis. Esto es debido a que el 76% de las proteínas totales que acompañaban a la PC atraviesan la membrana de diálisis junto con el LI, manteniéndose sólo el 24% de ellas acompañando a la PC. Cabe destacar que la recuperación de la PC que permanece dentro de la membrana es del 91%.

Con respecto a los carbohidratos, el proceso de diálisis consigue separar de nuevo las proteínas de los CH, quedándose en el extracto de PC dializado únicamente el 41% de los CH restantes. Por todo lo indicado anteriormente, el proceso de diálisis resultó necesario tanto para poder recuperar el LI y reutilizarlo en otros ciclos de extracción (como ya se vio en el *apartado 4.3*), como para separar la PC tanto de las proteínas como de los carbohidratos y así poder purificar dicho bioproducto de una manera eficaz.

Por último, se ha evaluado el reparto tanto de las proteínas restantes en el extracto dializado como los carbohidratos en la *etapa de precipitación* (figura 85).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

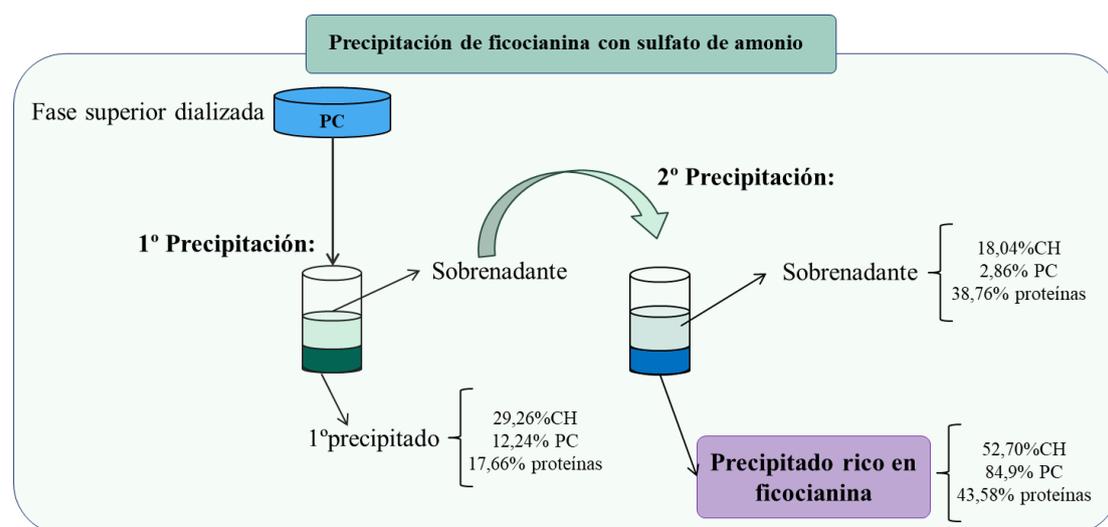


Figura 85. Balance de materia en el proceso de diálisis. *Proteínas no incluye la PC.

Cómo se puede apreciar en la figura 85, el 85% de la PC ha precipitado a una alta concentración de sulfato de amonio (50%) lo que significó que esta biomolécula es más soluble, es decir, menos hidrofóbica, que el resto de proteínas. Andrews y colaboradores [430] afirmaron que la hidrofobicidad de las proteínas se mide de forma general a través de la precipitación con sulfato de amonio, como el inverso de la solubilidad. Es decir, a concentraciones más bajas de sulfato de amonio precipitan las proteínas menos solubles (más hidrofóbicas) mientras que las proteínas más hidrofílicas precipitan a concentraciones de sal más elevadas, como es el caso de la PC y de alguna otra proteína afín (43%). El resto de las proteínas precipitan a bajas concentraciones de sulfato de amonio o quedan solubilizadas en el sobrenadante final resultante de la segunda precipitación. En la etapa de precipitación se ha conseguido retirar casi la mitad de las proteínas remanentes que provienen de la diálisis, lo que está en concordancia con el aumento de la pureza de PC de 2,4 a 4,22 (tabla 25).

Con respecto a los carbohidratos, de igual forma se ha conseguido separar de la PC la mitad de los CH remanentes, con lo cual se ha obtenido un extracto de PC purificado.

Para poder tener una visión general del balance de materia global del proceso, se muestra la figura 86 a continuación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

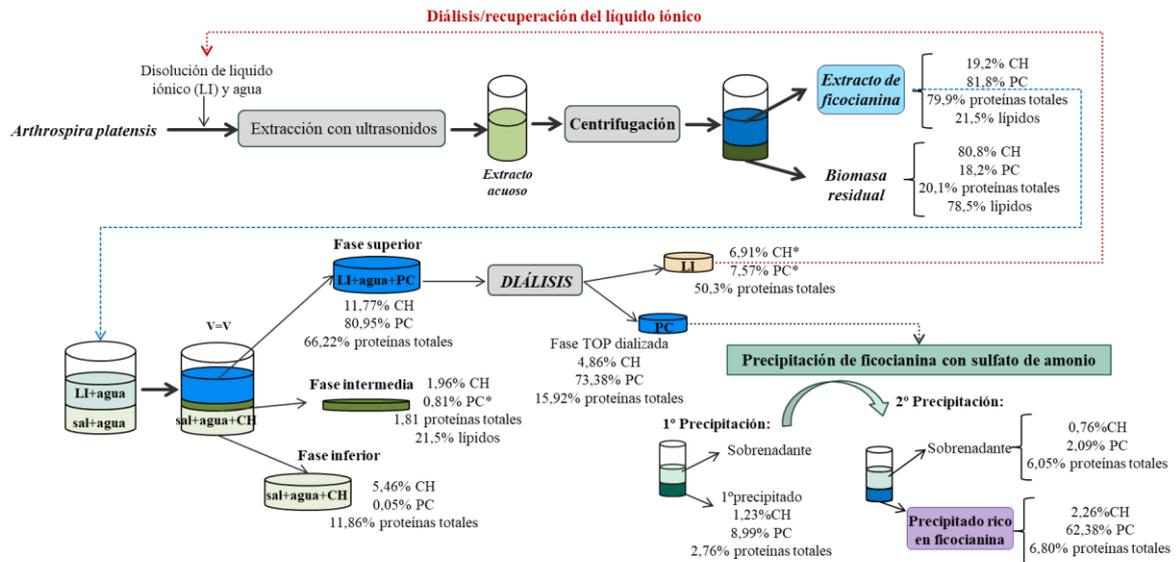


Figura 86. Balance de materia global en el proceso de purificación de PC para LI puro. *Proteínas no incluye la PC.

Para concluir, y tal y como se había comprobado con los balances de materia individuales de cada proceso, el balance global (figura 86) también corroboró que las etapas más relevantes para la purificación de la PC fueron la diálisis y la precipitación, puesto que en ellas se consiguió separar un 50,3% y un 8,81% de proteínas de la PC, respectivamente.

4.5.2.1 ATPS con LI recuperado

Tal y como se ha realizado en la etapa de extracción de PC, se quiso comprobar el efecto de la reutilización del LI [EMIM][EtSO₄] en el sistema de dos fases acuosas. Para ello, se eligió el mismo punto de mezcla mostrado en la *tie-line* de la figura 68 (18,10% sal, 22,67% LI y 59,23% agua) que equivale a volúmenes iguales entre la fase superior y la fase inferior ($V_{TOP} = V_{BOTTOM}$). Los resultados obtenidos en el sistema ATPS con LI reutilizado y los resultados de las siguientes etapas posteriores (diálisis y precipitación) se muestran en la tabla 26.

Tabla 26. Rendimiento de extracción (E_{PC}), recuperación, pureza (P_{PC}) y factor de purificación (PF) de PC para el método de purificación 2 (ATPS + diálisis + precipitación) con el LI [EMIM][EtSO₄] reutilizado.

Etapa	E_{PC} (mg/g)	Recuperación PC (%)	P_{PC}	PF
Extracto crudo de PC	75,4 ± 0,2	-	0,44 ± 0,01	-
Fase superior (ATPS)	74,1 ± 0,2	98,3 ± 0,3	2,9 ± 0,1	6,7 ± 0,3
Diálisis	70,5 ± 0,7	93,5 ± 1,3	2,60 ± 0,03	5,91 ± 0,03
Precipitación*	41,9 ± 1,1	55,6 ± 1,1	2,72 ± 0,01	5,98 ± 0,02

*Precipitado correspondiente a la 2ª precipitación (50% de saturación de sulfato de amonio)

El rendimiento de extracción (E_{PC}), disminuyó después de las etapas de ATPS (74,1 ± 0,2 mg/g) y diálisis (70,5 ± 0,7 mg/g) con respecto al valor del extracto crudo de PC (75,4 ± 0,2 mg/g), aunque su disminución no fue muy acusada. Las pérdidas de PC fueron más importantes después del paso de la precipitación (41,9 ± 1,1 mg/g). Aun así, estos resultados mostraron unas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

altas recuperaciones de PC utilizando el sistema ATPS ($98,3 \pm 0,3\%$) y la etapa de diálisis ($93,5 \pm 1,3\%$). Y aunque se apreció una recuperación menor en la etapa de precipitación ($55,6 \pm 1,1\%$), sigue estando en consonancia con la recuperación obtenida en un sistema en el que se emplea el LI puro e igualmente es superior a la obtenida en otros trabajos donde se realizaron pasos adicionales como la cromatografía de filtración en gel y la cromatografía de intercambio iónico [225,426].

Prestando atención a la pureza de PC obtenida en cada una de las etapas de purificación, se puede destacar que la pureza de PC aumentó a $2,9 \pm 0,1$, y el factor de purificación a $6,7 \pm 0,3$ después del proceso de ATPS, lo que significa que mediante el ATPS con LI reutilizado la pureza ha aumentado hasta casi 7 veces con respecto al extracto crudo de PC. Esto difiere en gran medida de la pureza obtenida en el sistema ATPS con el mismo LI [EMIM][EtSO₄] (0,57), pero siendo este puro (tabla 25). Sin embargo, a diferencia del proceso en el cual se utilizó un LI puro en el sistema ATPS; en el sistema ATPS con LI reutilizado la pureza de PC no aumentó en gran medida en las etapas posteriores de diálisis y precipitación, arrojando valores de pureza de $2,60 \pm 0,03$ y $2,72 \pm 0,01$, respectivamente.

En el sistema ATPS, los solutos y las biomoléculas a fraccionar tienen un tamaño definido (peso molecular y diámetro hidrodinámico) así como una geometría (conformación tridimensional) por lo que van a estar sujetos a efectos estéricos impuestos por los constituyentes del sistema. Estos efectos estéricos generalmente están relacionados con el volumen libre disponible (que es limitado) para que los solutos o las biomoléculas se fraccionen hacia una fase en concreto [431], por lo que cualquier alteración en dicho volumen disponible puede suponer un gran cambio para el sistema ATPS ya que es un sistema muy sensible a perturbaciones y puede verse afectado su equilibrio. Cuando se analizaron las fracciones de cada una de las etapas del proceso global (figura 86), se observó que el LI recuperado tras el proceso de diálisis, empleado en este apartado, iba acompañado de gran cantidad de proteínas totales (50,3%).

Por otro lado, se puede producir una alteración del volumen libre disponible en la fase superior del sistema ATPS que provoca la migración de las proteínas a la fase contraria a la que deberían ir y dicha migración puede ser consecuencia de:

1. Una alta concentración del LI en la fase superior del ATPS, lo que supone una reducción en el volumen libre disponible, con lo que algunas proteínas que van acompañando al extracto crudo de PC son excluidas de la fase superior del ATPS, desplazándolas a la fase inferior o a la intermedia [432]. Sin embargo, en el presente trabajo, la concentración del LI no se varió, siendo idéntica a la que se utilizó en el sistema ATPS con LI puro.
2. La presencia de proteínas a concentraciones relativamente bajas puede tener un efecto muy importante en el reparto de éstas en el sistema ATPS y se puede observar la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

precipitación o suspensión de ellas en la fase intermedia del sistema ATPS [236].

Como ya se ha mencionado anteriormente, el LI reutilizado que conformaba este sistema bifásico llevaba asociadas una gran cantidad de proteínas, que, junto con las que iban con el extracto de PC que se añadió al sistema ATPS, podrían hacer que se cumpla la segunda premisa propuesta anteriormente. Los sistemas bifásicos son sistemas en equilibrio, muy sensibles, en los que cualquier cambio en la concentración de LI, sal o las biomoléculas a separar, pueden alterar el sistema y cambiar el reparto de dichas biomoléculas objetivo. Esto demostraría el cambio en la distribución de proteínas en el sistema ATPS con LI reutilizado y la migración de éstas de la fase superior a otra fase; lo que implica el incremento de la pureza de PC. Sin embargo, para conocer la migración de las proteínas tanto en el sistema ATPS como en los demás procesos, se realizó de nuevo un análisis de proteínas, carbohidratos y lípidos y se planteó un balance de materia global para el LI reutilizado (figura 87). De esta forma, seguramente se podrá esclarecer el motivo por el cual, en este caso, la PC se purificó más en el sistema de dos fases acuosas empleando un LI reutilizado.

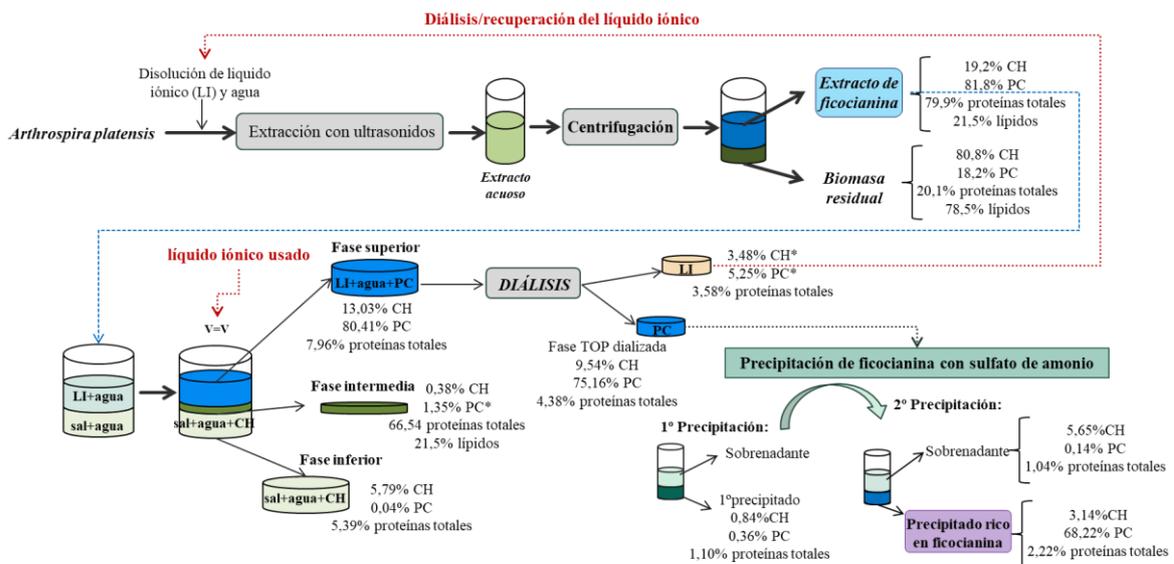


Figura 87. Balance de materia global en el proceso de purificación de PC para LI reutilizado. *Proteínas no incluye la PC.

Como se aprecia en la figura 87, en el sistema ATPS la mayoría de las proteínas que provenían del extracto de PC se han concentrado preferentemente en la fase intermedia (83%). Esto es debido a la disminución del volumen libre disponible en la fase superior del sistema ATPS (ya que los cationes del LI reutilizado llevan proteínas asociadas) por lo que no habrá suficiente espacio para acomodar PC ni otras proteínas. Debido a esta alta concentración de proteínas, las que eran menos afines al LI precipitaron o se quedaron suspendidas en la fase intermedia [236]. Además la PC, que tiene más afinidad por el LI (ya que es más hidrofílica), desplazó a las proteínas menos afines hacia esa fase intermedia (figura 88) y se concentró preferentemente en la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fase superior (98%). Únicamente el 7,96% de las proteínas permaneció en la fase superior, dato que difiere en gran medida con respecto al ATPS con LI puro (66,22%), por ese motivo la pureza de PC fue mayor para un sistema bifásico con LI reutilizado.

Para poder expresar de forma más visual el efecto que supone en el sistema ATPS tener una elevada concentración de proteínas, se muestra la figura 88.

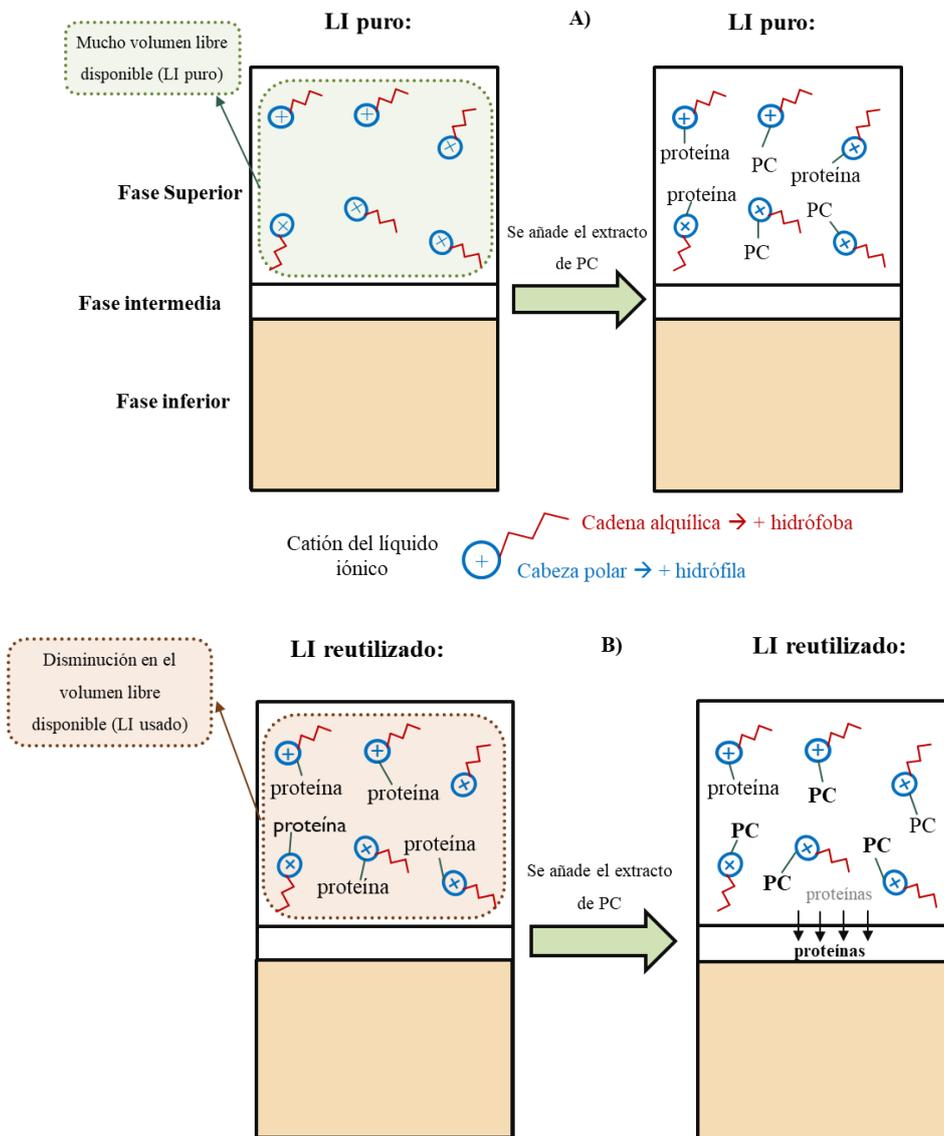


Figura 88: Esquema de reparto de proteínas en el sistema ATPS para LI puro (A) y para LI reutilizado (B).

Elaboración propia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se aprecia en la figura 88, la principal diferencia entre ambos sistemas ATPS radica en el uso de un LI puro (A) y reutilizado (B), respectivamente. Como se puede observar en el primer caso, los cationes del líquido iónico se encuentran libres, de esta forma, no hay limitación de volumen libre disponible e interaccionarán con ellos tanto la PC como las proteínas. En consecuencia, para un sistema ATPS con LI puro tanto la PC como las proteínas se concentrarán en la fase superior, limitando así la purificación de PC en este sistema.

Sin embargo, para el segundo caso (B), los cationes del LI ya no se encuentran libres, sino que, parcialmente están asociados o interactuando con proteínas, por lo que, el volumen libre disponible es menor que para el caso anterior. Esta disminución en el volumen libre disponible, unido al hecho de que hay una elevada concentración de proteínas en la fase superior del sistema ATPS (sobre todo cuando se añade el extracto al sistema), provoca la precipitación de las proteínas menos solubles hacia la fase intermedia. Esta precipitación está condicionada a la solubilidad/afinidad de las proteínas en el LI, siendo la PC la más soluble y estable, por lo que tendrá preferencia por la fase superior, mientras que el resto de proteínas, que son menos afines, se agruparán y migrarán a la fase intermedia, consiguiendo purificar en mayor grado la PC.

Por otro lado, con respecto a los carbohidratos, éstos se han distribuido entre las distintas fases del sistema ATPS, de forma que, una parte de ellos se ha concentrado entre la fase intermedia y la fase inferior (32,1% en total), con lo que el ATPS con LI reutilizado también resultó ventajoso en la separación de los CH de las proteínas. Además, la fracción lipídica remanente en el extracto crudo de PC (21%) que se incorporó al sistema ATPS, de igual forma que para el LI puro, se ha separado de las proteínas y de la PC, puesto que se ha concentrado en la *fase intermedia* [429].

Por este motivo, y tal y como se aprecia en la tabla 26 y analizando el reparto de proteínas en la figura 87, la etapa más relevante para la purificación de PC en el caso de reutilizar un LI fue el sistema de dos fases acuosas (ATPS), ya que tras este proceso únicamente quedaron el 9,96% de las proteínas totales (excluida la PC) en la fase superior, es decir se han conseguido concentrar, en las fases intermedia e inferior, el 90% de las proteínas totales.

Por ello, las siguientes etapas del proceso de purificación no contribuyeron demasiado en la pureza de PC. Concretamente tras la etapa de diálisis, considerando el balance global del proceso, se ha conseguido retirar únicamente el 3,58% de proteínas totales mientras que, en la etapa de precipitación, se ha separado un 2,1%, por ese motivo la pureza no aumentó en esta etapa final ($2,72 \pm 0,01$).

La pureza de PC obtenida mediante este proceso de purificación alcanzó el grado reactivo (2,5-3,5), pudiéndose utilizar como biomarcador en aplicaciones biomédicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar la reutilización del LI [EMIM][EtSO₄] en el sistema de dos fases acuosas, se puede concluir que los resultados no han resultado exitosos. Aunque se consiguió aumentar la pureza de PC en el primer paso de purificación, que fue el sistema ATPS; en las etapas posteriores, ésta no aumentó, quedándose en un grado 3 de pureza final.

Una vez conseguida la purificación de PC mediante el enfoque de purificación 2, se procedió a caracterizar las distintas fracciones de PC obtenidas en este proceso mediante electroforesis.

4.5.3. Electroforesis

Para analizar más a fondo la composición de la PC, se examinaron las distintas muestras obtenidas durante el proceso de purificación: extracto crudo de PC, fase superior del sistema ATPS y precipitado rico en ficocianina; mediante SDS-PAGE (figura 89-90). Todas ellas se analizaron por duplicado.

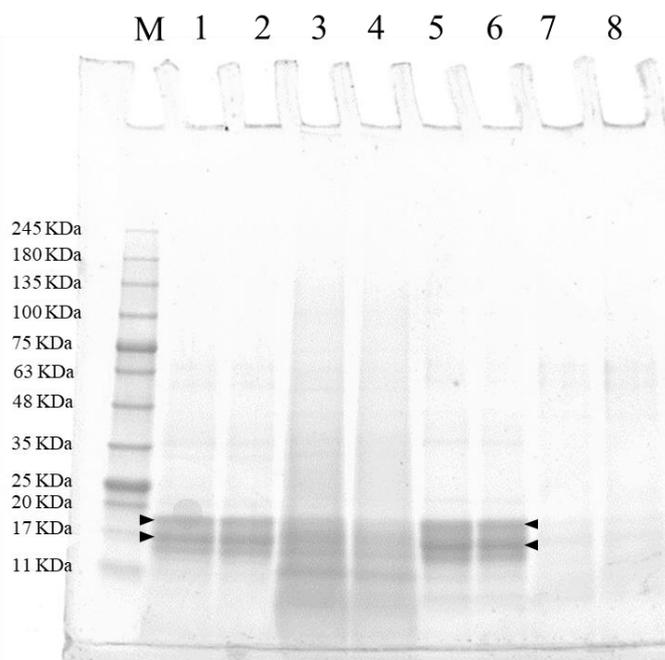


Figura 89. Análisis SDS-PAGE de las distintas muestras obtenidas durante el proceso de purificación de PC: calle *M* (marcadores de pesos moleculares, en kDa), calles 1-2 (patrón de PC comercial), calles 3-4 (extracto crudo de PC), calles 5-6 (precipitado rico en PC), calles 7-8 (fase superior del sistema ATPS con LI puro).

La identificación de los pesos moleculares de las diferentes bandas de las muestras (calles 1-8) se han llevado a cabo empleando el programa *UN-SCAN-IT*, introduciendo como calibrado los pesos moleculares del marcador de pesos moleculares, en kDa (*M*).

Varias bandas con diferentes intensidades se han resuelto en el gel con dos bandas principales en la región de 12–21 kDa que corresponden a la subunidad alfa y beta de la ficobiliproteína predominante (PC), de acuerdo con la bibliografía [433]. Estas cadenas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

polipeptídicas están presentes en cantidades equimolares siendo la unidad α de bajo peso molecular (17,6 kDa) mientras que la unidad β es de mayor peso molecular (18,05 kDa) [434,435]. Como se observa, las bandas características del patrón de PC (calles 1-2) se encuentran a pesos moleculares de $17,4 \pm 1,1$ y $14,7 \pm 1,1$ kDa, respectivamente, correspondientes a las cadenas β y α . Por otro lado, también se aprecia una banda a $34,7 \pm 1,0$ kDa, característica de proteínas conectoras [436].

Con respecto al extracto crudo de PC (calles 3-4) se pueden apreciar, de igual forma que para el patrón de PC, las bandas características (subunidades β y α). Sin embargo, también existen varias bandas a pesos moleculares menores entre 9-12 kDa que pueden ser debidas a otras proteínas presentes en el extracto.

En el caso del análisis mediante SDS-PAGE para la PC purificada (calles 5-6), también están presentes las bandas de las subunidades β y α ($16,4 \pm 1,1$ kDa y $14,0 \pm 1,1$ kDa) y, a diferencia del extracto crudo de PC se puede observar que, hay menos bandas resueltas en el gel y que las bandas correspondientes a proteínas de menor peso molecular (9-11 kDa) disminuyen su intensidad, lo que indica que la PC se ha purificado con respecto al extracto crudo. Al igual que la muestra patrón de PC en las muestras del precipitado rico en PC también se presenta la banda a $34,9 \pm 1,0$ kDa.

Por último, también se evaluó la presencia de bandas características para las muestras de la fase superior del sistema ATPS con LI puro (calles 7-8). Debido a problemas experimentales de miscibilidad, ya que se trata de muestras del sistema de dos fases acuosas, se aprecian las bandas características a $15,1 \pm 1,1$ kDa (subunidad β) y a $13,1 \pm 1,1$ kDa (subunidad α), pero son bandas mucho más tenues.

Tal y como se comentó anteriormente el proceso de purificación también se llevó a cabo utilizando un LI reutilizado en el sistema ATPS, por ello, también se analizaron las distintas fases del proceso mediante SDS-PAGE (figura 90).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

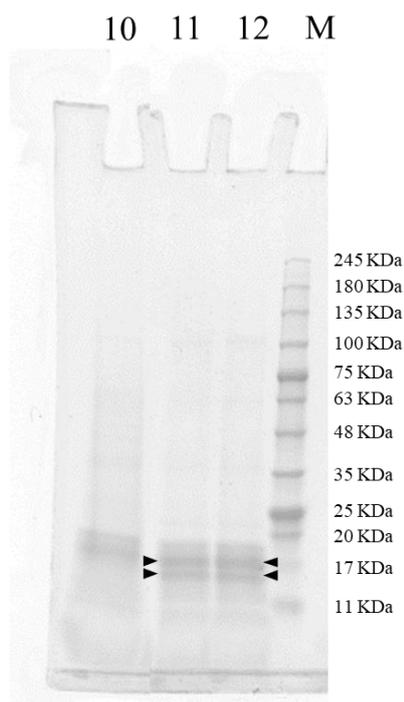


Figura 90. Análisis SDS-PAGE de las distintas muestras obtenidas durante el proceso de purificación de PC con ATPS LI reutilizado: calle *M* (marcador de pesos moleculares en kDa), calle *10* (fase superior del sistema ATPS, LI reutilizado), calles *11-12* (precipitado rico en PC).

Como se muestra en la figura 90, con respecto a la fase superior del sistema ATPS utilizando LI reutilizado (calle *10*), se aprecian las bandas características a $19,2 \pm 1,1$ y $18,2 \pm 1,1$ kDa correspondientes a las subunidades β y α , respectivamente. Igualmente, debido a problemas experimentales de miscibilidad, se puede observar que son algo borrosas.

Finalmente, se analizaron mediante SDS-PAGE las muestras de PC purificadas mediante precipitación tras el proceso de ATPS (con LI usado) + diálisis (calles *11-12*). Igualmente, se pueden apreciar las bandas a $15,8 \pm 1,1$ y $14,3 \pm 1,1$ kDa (subunidades β y α , respectivamente).

Las subunidades de proteína (α y β) están en la forma de trímero ($\alpha\beta$)₃ para la muestra de PC purificada (5-6) tal y como se muestra el análisis PAGE en estado nativo (figura 91), esto es así ya que la muestra purificada estaba disuelta en tampón fosfato a pH 7 y, en esas condiciones, la PC está en forma de trímero [76,418].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

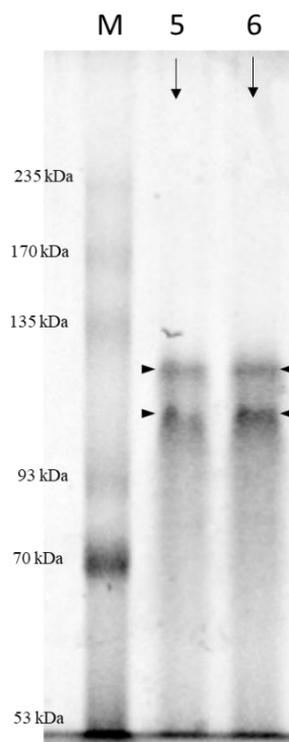


Figura 91. Análisis -PAGE en estado nativo de: calle *M* (marcador de pesos moleculares en kDa), calles 5-6 (precipitado rico en PC).

Con respecto a las muestras de PC purificadas (calles 5-6) presentan dos bandas principales una a $128,0 \pm 1,1$ kDa y la otra a $111,1 \pm 1,1$ kDa. La primera de ellas puede ser debida a la estructura de dímero de la PC $(\alpha\beta)_2$ (2 α de 17,6 kDa cada uno y 2 β de 18,1 kDa cada uno) repetida dos veces, y la segunda de ellas está en concordancia con que las subunidades α y β están en la forma $(\alpha\beta)_3$ confirmando que el peso molecular es de $111,1 \pm 1,1$ kDa (3 α de 17,6 kDa cada uno y 3 β de 18,1 kDa cada uno) [437].

El valor del Intervalo de confianza adecuado para el valor medio del peso molecular a cada posición de la banda en el gel correspondiente se obtiene de la desviación estándar del valor medio junto con la distribución t-Student para el 95% de confianza con dos grados de libertad.

Por lo que una vez conseguida la purificación de PC mediante el enfoque de purificación 2, y caracterizado mediante electroforesis, se procedió a valorizar la biomasa residual obtenida (rica en lípidos y carbohidratos) mediante licuefacción hidrotérmica y digestión anaerobia (apartado 4.6).

4.6. Aprovechamiento de la biomasa residual

Con el fin de revalorizar la biomasa residual resultante del proceso de extracción de ficocianina, se ha realizado un proceso de licuefacción hidrotérmica (HTL) y un proceso de digestión anaerobia para producir bioaceite y biometano, respectivamente. Para ello, resultó imprescindible saber el contenido en proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas que caracterizaba dicha biomasa residual, así como su análisis elemental tal y como se muestra a continuación en el apartado 4.6.1.

4.6.1. Caracterización de la biomasa residual

Antes de presentar la caracterización bioquímica y el análisis elemental de la biomasa se presenta la tabla 27 donde se resumen los resultados de la composición bioquímica de ambas fases resultantes de la extracción (en base seca): el extracto crudo de ficocianina y el “pellet” o biomasa residual obtenida.

Tabla 27. Composición de las fracciones obtenidas en la extracción de ficocianina (en base seca).

Composición bioquímica (p/p%)	Extracto crudo	Biomasa residual
Proteínas totales*	52,2 ± 2	13,2 ± 1,0
- Ficocianina	7,2 ± 0,2	1,6 ± 0,2
Ficobiliproteínas		
- Aloficocianina	1,63 ± 0,09	1,6 ± 0,3
- Ficoeritrina	1,00 ± 0,05	0,7 ± 0,1
Lípidos	2,4*	8,8 ± 1,0
Carbohidratos totales	3,7*	15,7 ± 4,0
Cenizas	2,6*	2,8 ± 0,2

*Incluidas ficobiliproteínas.

Como ya se había mencionado previamente, las ficobiliproteínas se encontraban mayoritariamente en el extracto crudo (72%), lo que indicaba la idoneidad del método de extracción propuesto para obtener este tipo de proteínas, especialmente en el caso de la ficocianina, para la cual se alcanzó un rendimiento de extracción del 82%. Este parámetro rara vez se estudia en la literatura, ya que la mayoría de los autores suelen publicar la concentración de ficocianina [124,147,148]. De igual forma, como era de esperar, los lípidos y carbohidratos permanecieron principalmente en la biomasa residual (79% y 81%, respectivamente). Esa concentración de lípidos y carbohidratos en la biomasa residual (tabla 28) hizo de ésta una biomasa muy atractiva en el ámbito de la bioenergía y podría utilizarse para producir biogás, bioetanol y bioaceite, entre otros y/o bioproductos como pigmentos, nanocelulosa, etc. en un esquema de biorrefinería dentro de un marco de economía circular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 28. Composición bioquímica de la biomasa residual tras el proceso de extracción de ficocianina de *Arthrospira platensis* junto con su análisis elemental (en base seca).

Composición bioquímica (%p/p)		Composición elemental (p/p%)	
Proteínas totales	32,5 ± 1,0	C	48,8 ± 0,1
- Ficocianina	8,0 ± 0,2	H	7,2 ± 0,1
- Aloficocianina	3,46 ± 0,09	N	9,2 ± 0,03
- Ficoeritrina	8,1 ± 0,3	S	0,24 ± 0,04
Lípidos	21,8 ± 0,4	O	22,4 ± 0,5
Carbohidratos totales	38,7 ± 3,6		
Cenizas	7,0 ± 0,2		

*Incluidas ficobiliproteínas.

Tal y como se observa en la tabla 28 la composición bioquímica de la biomasa residual obtenida tiene un mayor contenido en lípidos y carbohidratos ($21,8 \pm 0,4$ y $38,7 \pm 3,6\%$, respectivamente) que la biomasa completa de *Arthrospira platensis* ($11,2 \pm 0,8$ y $19,4 \pm 1,3\%$, respectivamente) así como un menor contenido en proteínas ($32,5 \pm 1,0\%$). Esa extracción previa de proteínas en el extracto crudo de PC se hizo notable en la composición elemental de la biomasa residual ($9,2 \pm 0,03\%$) frente a la composición elemental del nitrógeno en *A. platensis* ($11,0 \pm 0,1\%$), con respecto al carbono, hidrógeno, azufre y oxígeno no hubo muchas diferencias entre ambas biombras.

4.6.2. Proceso de HTL

En este apartado se ha analizado el proceso de HTL a partir de la biomasa residual de *A. platensis* generada tras el proceso de extracción de ficocianina (biorrefinería 1) expuesto en el apartado 4.2. Se analizará la influencia de la temperatura y de la presencia o no de cosolventes (metanol, etanol e isopropanol), comparándola, de igual forma, con la producción de bioaceite de la biomasa completa de *A. platensis*.

El rendimiento de las diferentes fracciones obtenidas (bioaceite, fase acuosa, residuo sólido y fase gaseosa) a partir del proceso de HTL llevado a cabo a dos temperaturas de reacción (300°C y 350°C) y para distintos cosolventes manteniendo un tiempo de reacción de 30 minutos, se muestran en las figuras 92 y 93, respectivamente.

A. platensis no está considerada entre las cianobacterias con mejores características para llevar a cabo la licuefacción hidrotérmica (HTL) por su bajo contenido en lípidos; sin embargo, la revalorización energética de su biomasa residual que es más rica en carbohidratos y lípidos puede ser una buena alternativa para evitar desechar los residuos en el marco de una economía circular. El rango de temperaturas óptimas para *A. platensis* se encuentra entre $300\text{-}350^{\circ}\text{C}$ de acuerdo con la bibliografía [438]. Según Toor y colaboradores [439], la temperatura óptima para dicha microalga fue de 310°C . Asimismo, en otros trabajos se comprobó que la temperatura tiene un efecto muy significativo en el rendimiento a bioaceite, mientras que el tiempo de reacción

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

influyó en menor medida [438]. Por otro lado, diversos estudios, concretamente el de Parimi y colaboradores [368], demostraron que a 350°C y un tiempo de reacción de 30 minutos se alcanzaba el máximo rendimiento a bioaceite. Todo esto confirmó que, dentro de una misma especie de microalga o cianobacteria, la temperatura óptima de trabajo no se conoce previamente en el proceso de HTL, por ello, en el presente trabajo, se ha trabajado a 300°C y a 350°C.

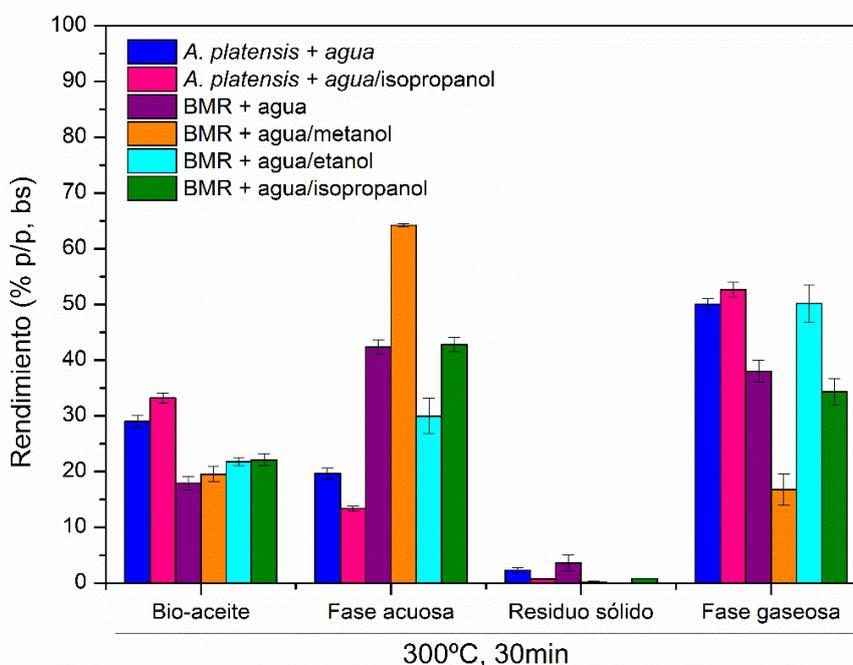


Figura 92. Rendimientos de las diferentes fases (% p/p, bs) después del proceso de HTL para 300°C y 30 minutos con la biomasa completa de *Arthrospira platensis* y con la biomasa residual húmeda.

Como se puede apreciar, el rendimiento del bioaceite generado a partir de la licuefacción hidrotérmica de *A. platensis* ($29,0 \pm 1,1\%$ p/p, bs) está en concordancia con rendimientos obtenidos bibliográficamente [440], y fue más alto que el obtenido a partir de la biomasa residual ($17,9 \pm 1,2\%$ p/p, bs), tanto con el proceso de HTL con agua como utilizando alcoholes como cosolventes. Esto se puede deber principalmente a que, en dicha biomasa residual, aunque posee un mayor contenido lipídico que la biomasa completa de *A. platensis*, la mayor parte de las proteínas han sido extraídas (~80%) y son el segundo contribuyente más importante a la formación del bioaceite, tal y como estudiaron Biller y colaboradores [441]. Esto, junto con el empleo de una temperatura inferior, puede haber causado una menor conversión del componente proteico, con la consecuente disminución en el rendimiento a bioaceite [442].

El rendimiento del bioaceite aumentó con la utilización de cosolventes (metanol, etanol e isopropanol) tanto para la biomasa de *A. platensis* como para la biomasa residual, de acuerdo con estudios previos en los que se demostró que la utilización de alcoholes mejora tanto el rendimiento como la calidad del bioaceite [351,352,440]. El disolvente que presentó mejores resultados con respecto al bioaceite producido a partir de la biomasa residual fue el isopropanol

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

($22,1 \pm 1,1\%$ p/p, bs).

El rendimiento de la fase acuosa aumentó con el uso de metanol, en el caso de la biomasa residual. Dicho incremento puede deberse a la mayor solubilidad que presenta el metanol en agua; ya que cuando se aislaba la reacción y se separaban ambas fases (la acuosa y la orgánica) al adicionarse diclorometano, la mayor parte del metanol (junto con ciertos compuestos polares) se disolvió en la fase acuosa. De igual forma esto se vio reflejado en la disminución acusada de la fase gaseosa.

Por último, los rendimientos del residuo sólido disminuían cuando se utilizaban cosolventes, aunque no de forma significativa. Por ejemplo, para la biomasa residual húmeda el rendimiento de sólidos fue de $3,7 \pm 1,1\%$ p/p, (bs) y para esta misma biomasa con isopropanol, dicho rendimiento disminuyó hasta un valor de $0,80 \pm 0,03\%$ p/p, (bs). Esto es debido a que, al utilizar alcoholes, se favoreció la extracción de componentes como lípidos y proteínas, y sus productos de reacción pasaron a formar parte del bioaceite, de la fase gaseosa o de la acuosa.

Entre los cosolventes estudiados en el proceso de HTL, a 300°C , el etanol e isopropanol fueron los que presentaban mayores rendimientos de bioaceite ($21,8 \pm 0,8$ y $22,1 \pm 1,1\%$ p/p, (bs), respectivamente).

A continuación, en la figura 93, se muestran los resultados de las distintas fracciones para el proceso de HTL a 350°C . En estas condiciones, únicamente se utilizó isopropanol como cosolvente ya que la presión dentro del reactor excedió el límite máximo cuando se utilizó metanol y etanol.

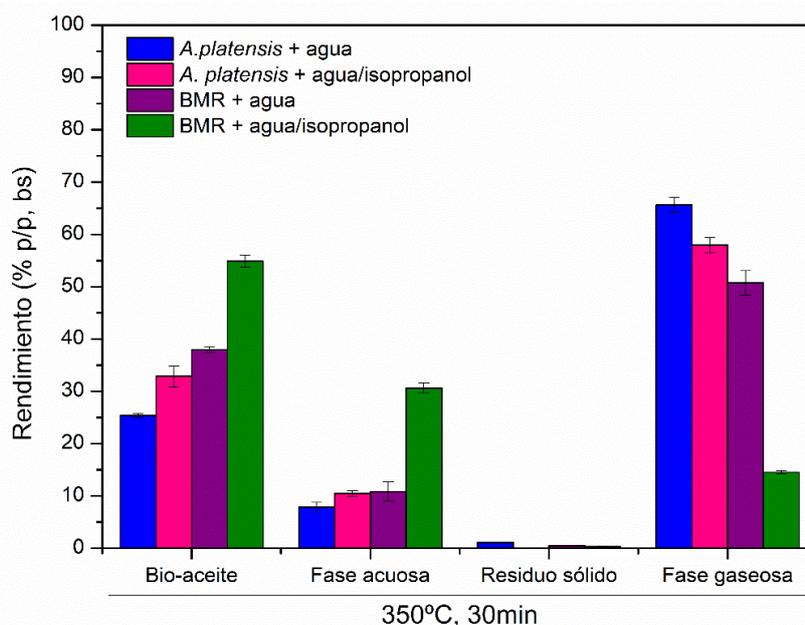


Figura 93. Rendimientos de las diferentes fases (% p/p, bs) después del proceso de HTL a 350°C y 30 minutos con la biomasa de *Arthrospira platensis* y la biomasa residual húmeda (BMR).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparando las figuras 92 y 93, de forma general, al aumentar la temperatura de 300°C a 350°C aumentó el rendimiento a bioaceite. Para la biomasa residual, se ha obtenido el mejor resultado con el uso de isopropanol ($54,9 \pm 1,1\%$ p/p, bs).

Sin embargo, para el caso concreto de *A. platensis*, el mayor rendimiento a bioaceite se obtuvo a 300°C tanto con cosolvente como sin él ($33,2 \pm 0,9$ y $29,0 \pm 1,1\%$ p/p, bs, respectivamente) mientras que a 350°C el rendimiento a bioaceite fue de $25,4 \pm 0,4\%$ p/p, bs y en presencia de isopropanol fue de $32,9 \pm 2,0\%$ p/p, bs. Esta disminución en el rendimiento se debió a que la temperatura óptima para el proceso de HTL de dicha cianobacteria es de aproximadamente 300°C, tal y como se había mencionado antes y, disminuyendo el rendimiento para temperaturas superiores [443]. Esta disminución se debe, principalmente, a la formación de hidrocarburos más livianos y volátiles que no fueron retenidos en la fase de bioaceite ni en los compuestos de mayor peso molecular presentes en la fase sólida, sino que pasaron a la fase gaseosa. Por ello, se puede apreciar un aumento en la fase gaseosa para el caso particular de *A. platensis* que pasó de tener rendimientos de $50,0 \pm 1,0$ y $52,6 \pm 1,4\%$ p/p (bs) a 300°C a tener rendimientos de $65,7 \pm 1,5$ y $57,9 \pm 1,5\%$ p/p, (bs) a 350°C sin y con cosolvente, respectivamente.

Por otro lado, el rendimiento a bioaceite para la biomasa residual a 350°C ($37,9 \pm 0,5\%$ p/p, bs) fue mayor que el rendimiento a bioaceite obtenido a 300°C con dicha biomasa ($17,9 \pm 1,2\%$ p/p, bs). Según Xu y colaboradores [444], la temperatura es un factor determinante en la cantidad y la calidad del bioaceite, ya que al aumentar la temperatura no solo se produce un aumento en la producción de bioaceite, sino que, además, éste tiene un menor contenido de heteroátomos (nitrógeno y oxígeno). Todo esto, unido al hecho que con temperaturas más elevadas se pueden extraer mejor los lípidos (que son los que tienen más tendencia a la formación de bioaceite) y, que la biomasa residual es más rica en lípidos, en comparación con la biomasa completa; hace que se hayan obtenido mayores rendimientos a bioaceite.

Como se observa en la figura 93, la adición de isopropanol aumentó de forma importante el rendimiento a bioaceite en el proceso de HTL a 350°C utilizando la biomasa residual, tal y como se vio anteriormente para el proceso de HTL a 300°C (figura 92). De esta forma, se logró incrementar el rendimiento a bioaceite de $37,9 \pm 0,5\%$ usando agua a $54,9 \pm 1,1\%$ usando isopropanol como cosolvente. En resumen, el uso de alcoholes como cosolventes en combinación con temperaturas más altas (350°C) produjo mayores rendimientos de bioaceite por la mejora en la capacidad de extracción de lípidos hacia la fase orgánica que tienen dichos alcoholes [398,445].

Con respecto a los rendimientos de las fases acuosas a 350°C, cabe destacar que disminuyeron en todos los casos con respecto a los obtenidos a 300°C, ya que disminuye el contenido de compuestos orgánicos disueltos en agua. De igual forma, aunque los rendimientos a la fracción sólida ya eran bajos a 300°C, a 350°C disminuyeron aún más [344]. Por el contrario,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en todos los casos, (excepto en el caso de utilizar la biomasa residual con isopropanol) al incrementar la temperatura aumentó la fracción gaseosa. En general, el rendimiento de la fase gaseosa se incrementa de forma continua al aumentar la temperatura hasta un punto de saturación [446].

❖ Caracterización del bioaceite

En la tabla 29, se muestra la composición elemental y la energía recuperada (ER) en el bioaceite obtenido por HTL a 300°C con las dos biomásas estudiadas en la presente tesis doctoral: *Arthrospira platensis*, y su biomasa residual tras la extracción de ficocianina.

En todos los bioaceites obtenidos a 300°C se observó una disminución, significativa, cercana al 60%, del contenido en O con respecto a la biomasa inicial de *A. platensis* ($22,1 \pm 0,4\%$ p/p, bs) y del 50% para el caso de la biomasa residual ($22,4 \pm 0,5\%$ p/p, bs). Estos resultados indicaron la presencia de reacciones de descarboxilación durante el proceso de HTL, las cuales se intensificaron con el aumento de la temperatura [447]. Sin embargo, para todos los casos en los que se utilizaron cosolventes se pudo apreciar un ligero aumento en el contenido en O con respecto al uso de agua como disolvente. Esto puede ser debido a la reducción de la polaridad de la mezcla de cosolvente al utilizar alcoholes, lo que puede cambiar ligeramente la distribución de los productos orgánicos entre las fases acuosa y de bioaceite [448].

El contenido en N de los bioaceites obtenidos a 300°C se redujo en un 24% para el caso de utilizar como biomasa de partida la biomasa residual ($9,2 \pm 0,03\%$ p/p, bs) y en casi un 30% para *A. platensis* como biomasa inicial ($11,0 \pm 0,1\%$ p/p, bs), debido a las reacciones de desnitrogenación del HTL [449]. De igual forma que sucedió con el O, se observa un ligero aumento en el contenido en N cuando se emplean alcoholes con respecto a utilizar agua como disolvente. Esto es debido a que, al añadir alcoholes, generalmente, se consigue una conversión más completa del componente proteico de las proteínas de la biomasa, con el consiguiente aumento de la concentración de N en el bioaceite. Por ello, los bioaceites generados a partir de la biomasa residual con agua como disolvente a 300°C y 30 minutos contenían la menor proporción de N ($5,94 \pm 0,04\%$ p/p, bs); no obstante, el rendimiento del bioaceite en estas condiciones fue bajo ($17,9 \pm 1,2\%$ p/p, bs).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 29. Análisis elemental (% p/p. bs) y energía recuperada de los bioaceites generados a 300°C y 30 minutos para las dos biomásas: *Arthrospira platensis* y biomasa residual húmeda (BMR).

Biomasa + disolvente	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	O (%)	ER (%)
<i>A. platensis</i> + agua	75,1 ± 0,5	9,27 ± 0,02	6,45 ± 0,03	0,87 ± 0,02	8,3 ± 0,3	39,0 ± 0,5
<i>A. platensis</i> + isopropanol	71,1 ± 0,4	9,1 ± 0,2	9,1 ± 0,2	0,59 ± 0,01	10,1 ± 0,8	48,3 ± 0,7
BMR + agua	75,8 ± 0,4	9,5 ± 0,2	5,94 ± 0,04	0,81 ± 0,01	7,9 ± 0,1	24,8 ± 0,6
BMR + metanol	72,6 ± 0,3	8,96 ± 0,01	6,4 ± 0,2	0,85 ± 0,02	11,25 ± 0,03	25,5 ± 0,3
BMR + etanol	68,4 ± 0,6	8,7 ± 0,1	8,37 ± 0,01	1,8 ± 0,2	12,7 ± 0,3	27,0 ± 0,6
BMR + isopropanol	71,32 ± 0,05	9,10 ± 0,04	7,4 ± 0,2	1,33 ± 0,08	10,9 ± 0,3	25,6 ± 0,3

Las disminuciones observadas en los contenidos de O y N son típicas en el proceso de HTL con microalgas, lo que provoca que los contenidos en C ($68,4 \pm 0,6 - 75,8 \pm 0,4\%$ p/p, bs) y H ($8,7 \pm 0,1 - 9,5 \pm 0,2\%$ p/p, bs) aumenten con respecto a las biomásas de partida (tablas 9 y 28).

A pesar de las mejoras notables en los bioaceites producidos con respecto a las biomásas de partida, la composición elemental obtenida indica que no pueden usarse, al menos directamente, como combustibles para el transporte. Sería necesario adicionar una etapa de hidrotreamiento posterior para reducir el contenido en O y N, mejorar la composición química de los bioaceites y así cumplir con la normativa estándar [450,451] en relación con el contenido de ambos heteroátomos en combustibles comerciales como el crudo obtenido de biorrefinería y el diésel.

La energía recuperada (ER) de los bioaceites aumentó, con el uso de cosolventes, de forma más notable para el caso de *A. platensis*. Las mayores ER se obtuvieron para isopropanol en el caso de la biomasa completa ($48,3 \pm 0,7\%$) y para etanol e isopropanol para la biomasa residual ($27,0 \pm 0,6\%$ y $25,6 \pm 0,3\%$). Por lo tanto, se ha recuperado aproximadamente la mitad de la energía total de la microalga inicial para el caso de *A. platensis* y casi un 30% de la energía total de la biomasa residual.

A modo comparativo y para poder analizar el efecto de la temperatura en todos los parámetros anteriormente mencionados para los bioaceites obtenidos, se estudió el proceso de HTL para ambas biomásas a una temperatura mayor (350°C).

En la tabla 30, se muestra la composición elemental y la energía recuperada (ER) en el bioaceite obtenido por HTL a 350°C con las dos biomásas estudiadas en la presente tesis doctoral: *A. platensis*, y su biomasa residual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 30. Análisis elemental (% p/p. bs) y energía recuperada de los bioaceites generados a 350°C y 30 minutos para las dos biomasa: *Arthrospira platensis* y biomasa residual húmeda (BMR).

Biomasa + disolvente	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	O (%)	ER (%)
<i>A. platensis</i> + agua	73,8±0,2	9,08 ± 0,01	6,22 ± 0,06	0,45 ± 0,09	10,5 ± 0,2	35,2 ± 0,5
<i>A. platensis</i> + isopropanol	73,0 ± 0,5	9,33 ± 0,04	8,3 ± 0,2	0,56 ± 0,04	8,79 ± 0,01	39,2 ± 0,5
BMR + agua	74,4 ± 0,3	9,70 ± 0,02	6,5 ± 0,1	0,34 ± 0,04	9,0 ± 0,2	55,9 ± 0,4
BMR + isopropanol	76,3 ± 0,2	10,4 ± 0,1	5,2 ± 0,2	0,60 ± 0,02	7,5 ± 0,2	78,4 ± 0,5

De igual forma que para 300°C, en todos los bioaceites obtenidos a 350°C se observó una disminución del contenido en O con respecto a la biomasa inicial. Para el caso de la biomasa completa esa disminución fue cercana a un 56% mientras que para la biomasa residual fue de un 63%, ligeramente mayor que a 300°C. Estos resultados corroboran lo que se mencionó anteriormente; por un lado, que existen reacciones de descarboxilación durante el proceso de HTL, y por otro, que se intensifican con el aumento de la temperatura [447]. También se observa que, a estas temperaturas más elevadas y empleando isopropanol como cosolvente, se redujo aún más el contenido en O con respecto al uso de agua como disolvente.

El contenido en N de los bioaceites obtenidos a 350°C se redujo en un 37% a partir de la biomasa residual ($5,2 \pm 0,2 - 6,5 \pm 0,1\%$ p/p, bs) con respecto al contenido inicial de la biomasa residual ($9,2 \pm 0,03\%$ p/p, bs) y en casi un 34% para *A. platensis* ($6,22 \pm 0,06 - 8,3 \pm 0,2\%$ p/p, bs) con respecto a la biomasa inicial ($11,0 \pm 0,1\%$ p/p, bs), debido a las reacciones de desnitrificación durante el proceso de HTL [449]. Se observa que, ese incremento de temperatura va asociado con una disminución mayor en el contenido de N. Sin embargo, se aprecia un ligero aumento en el contenido en N en la biomasa completa cuando se emplearon alcoholes con respecto al uso de agua como disolvente. Esto es debido a que, al añadir alcoholes y junto con una mayor temperatura, generalmente, se consigue una conversión más completa de las proteínas de la biomasa al bioaceite. Por el contrario, el bioaceite generado a partir de la biomasa residual con isopropanol como disolvente a 350°C y 30 minutos contiene la menor proporción de N ($5,2 \pm 0,2\%$ p/p, bs); y, asimismo, el rendimiento del bioaceite con esta biomasa y en esta condición de temperatura fue bastante alto ($54,9 \pm 1,1\%$ p/p, bs).

Como ya se mencionó, las disminuciones observadas en los contenidos de O y N son típicas en el proceso de HTL con microalgas, lo que provoca que los contenidos en C ($73,0 \pm 0,5 - 76,3 \pm 0,2\%$ p/p, bs) y H ($9,08 \pm 0,01 - 10,4 \pm 0,1\%$ p/p, bs) aumenten con respecto a las biomasa de partida (tablas 9 y 28).

A pesar de las mejoras notables con respecto a la biomasa de partida, la composición elemental de los bioaceites obtenidos indica que no podrían usarse directamente como combustibles para el transporte. Es necesario añadir una etapa de hidrotratamiento posterior para

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

reducir el contenido en O y N.

La energía recuperada de los bioaceites aumentó sobre todo para la biomasa residual tanto con el uso de cosolvente como con agua. Las mayores ER se obtuvieron para isopropanol en el caso de la biomasa residual ($78,4 \pm 0,5\%$). Por lo tanto, se recupera aproximadamente el 80% de la energía total de la biomasa inicial para el caso de la biomasa residual y casi un 40% de la energía total para *A. platensis*.

Es bien conocido que las propiedades de los biocombustibles están muy influenciadas por las relaciones atómicas H/C, N/C y O/C. Estas relaciones de los bioaceites para la microalga *A. platensis* y para la biomasa residual con y sin isopropanol para 300°C y 350°C se han representado para compararlas en diagramas de Van Krevelen (Figura 94). Los resultados mostraron una reducción de las relaciones O/C y N/C en los bioaceites producidos con respecto a las biombras de partida, la cual es debida a las reacciones de desnitrogenación y descarboxilación que ocurren durante el proceso de HTL [452].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

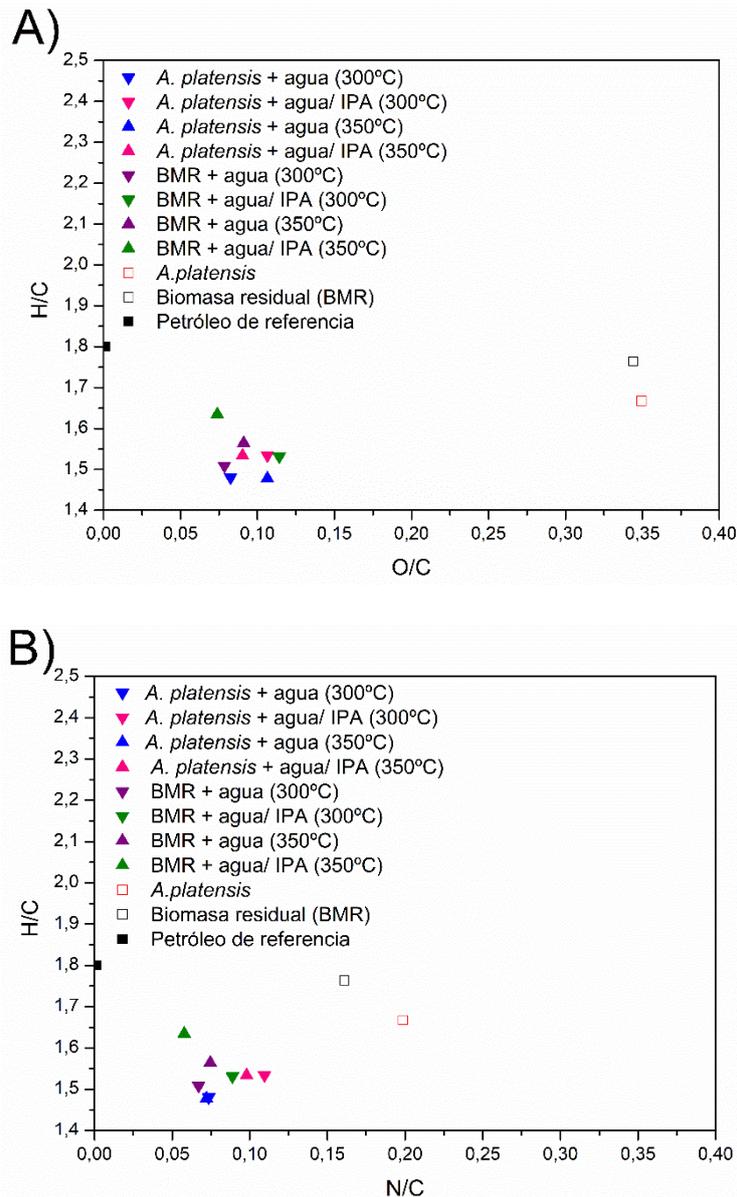


Figura 94. Diagramas de Van Krevelen de los bioaceites producidos mediante HTL a partir de *Arthrospira platensis* y de la biomasa residual (BMR). A) O/C vs. H/C y B) N/C vs. H/C. A 300°C y a 350°C.

La proporción O/C de los bioaceites obtenidos descendió en un 69,5% para el caso de utilizar *A. platensis* en presencia de isopropanol a 300°C y en un 74,2% en presencia de isopropanol a 350°C con respecto a las relaciones O/C de la biomasa inicial de *A. platensis*. Por otro lado, para los bioaceites producidos a partir de la biomasa residual la proporción O/C descendió en un 66,8% en el caso de utilizar isopropanol a 300°C y en un 78,5% utilizando isopropanol a 350°C respecto a las relaciones O/C de la biomasa residual, siendo esta reducción mayor con el aumento de la temperatura y la presencia de dicho alcohol (figura 94. A). La relación O/C para la biomasa de *A. platensis* (0,35), están dentro del rango usual encontrado en literatura [453]. Asimismo, las relaciones O/C obtenidas para los bioaceites (0,07-0,11) están dentro del rango encontrado en bibliografía para los obtenidos de esta cianobacteria (0,05-0,25) [453].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De forma general, se observa una ligera descarboxilación comparando ambas biomásas de partida [454]. Resulta menor la relación O/C para la biomasa residual, lo que implica que los bioaceites generados por ella también tendrán una relación O/C más baja.

Se pudo comprobar que, la relación O/C para los bioaceites de la biomasa residual descendió al aumentar la temperatura y al usar isopropanol con respecto a la relación O/C de los bioaceites obtenidos de *A. platensis*. Se puede observar una posible descarboxilación a 350°C comparando el bioaceite obtenido a partir de la biomasa residual en presencia de isopropanol con los demás bioaceites: el obtenido a partir de la biomasa residual húmeda y el obtenido a partir de la biomasa de *A. platensis*, tomado éste como el bioaceite de referencia.

Se ha detectado que la presencia de isopropanol implica una pérdida de oxígeno en los bioaceites producidos que puede ser causada por descarboxilación, pero también podrían ocurrir reacciones de descarboxilación o que los compuestos oxigenados pasen a la fase acuosa. Todos estos procesos o reacciones se ven favorecidos por el uso de dicho cosolvente y de una elevada temperatura.

Con respecto a la relación N/C que contenían las biomásas de partida, primeramente, se observó un descenso de este valor para la biomasa residual con respecto a la biomasa completa de *A. platensis* (aproximadamente del 20%). De igual forma, hubo un gran descenso del valor N/C de los bioaceites obtenidos con respecto a las biomásas de partida. Para los bioaceites producidos a partir de la biomasa de *A. platensis* la proporción N/C descendió en un 44,9% en el caso de utilizar isopropanol a 300°C y en un 50,7% en el caso de utilizar isopropanol a 350°C respecto a las relaciones N/C de la biomasa de partida. Por otro lado, para los bioaceites producidos a partir de la biomasa residual la proporción N/C descendió en un 44,8% en el caso de utilizar isopropanol a 300°C y en un 64,1% utilizando isopropanol a 350°C con respecto a las relaciones N/C de la biomasa residual inicial (figura 94. B).

Las mayores relaciones N/C se obtuvieron para los bioaceites generados a 300°C a partir de la biomasa completa de *A. platensis* (~ 0,11) y para el caso de usar isopropanol. Sin embargo, a esta temperatura, para el caso de utilizar agua se observan menores valores N/C (~ 0,07). Esto es debido a que al añadir el alcohol se consigue una conversión más completa del componente proteico, rico en nitrógeno, que pasa al bioaceite. Por otro lado, el aumento de temperatura no parece tener un gran efecto en la relación N/C de los bioaceites, excepto para el caso de la biomasa residual utilizando isopropanol que tiene un valor de 0,09 a 300°C y 0,05 a 350°C. Además, en todos los casos en los que se utiliza biomasa residual, esta relación es menor que cuando se utiliza la biomasa completa. Asimismo, todos los valores de N/C obtenidos estuvieron entre los intervalos encontrados en literatura (0,025-0,1) [453].

Teniendo en cuenta las relaciones O/C y N/C de los bioaceites, la biomasa residual fue

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

una materia prima bastante prometedora para el proceso de HTL en comparación con la biomasa completa de la cianobacteria *A. platensis*. Sin embargo, la relación H/C disminuyó ligeramente desde un valor de 1,76 para dicha biomasa residual hasta un intervalo de valores de la relación H/C de 1,51-1,63 para los bioaceites obtenidos a partir de ella. Cabe destacar, que para este último valor obtenido de H/C, próximo al de un crudo de petróleo, se han obtenido altos rendimientos a bioaceite ($54,9 \pm 1,1\%$ p/p, bs), aunque todos los valores se encuentran dentro del rango bibliográfico de 1,37-1,62 para bioaceites de microalgas [455].

Todas las relaciones previamente comentadas muestran que el contenido, aún elevado, de N y O en los bioaceites obtenidos requieren de un tratamiento posterior para la mejora de la calidad de los mismos.

En la figura 95 se muestran los poderes caloríficos superiores (HHV) de los bioaceites obtenidos a partir de *A. platensis* y de la biomasa residual a 300°C y 350°C. Se puede afirmar que los HHV para *A. platensis* fueron muy similares para ambas temperaturas y con el uso o no de alcohol, pero para el caso de la biomasa residual se obtienen valores bastante más altos a 350°C y con la presencia de isopropanol ($39,7 \pm 0,2$ MJ/kg). Todos los valores de HHV de los bioaceites obtenidos se encuentran dentro del intervalo observado para bioaceites producidos a partir de otras microalgas (30-43 MJ/kg) [456] y son próximos al del crudo de petróleo [328].

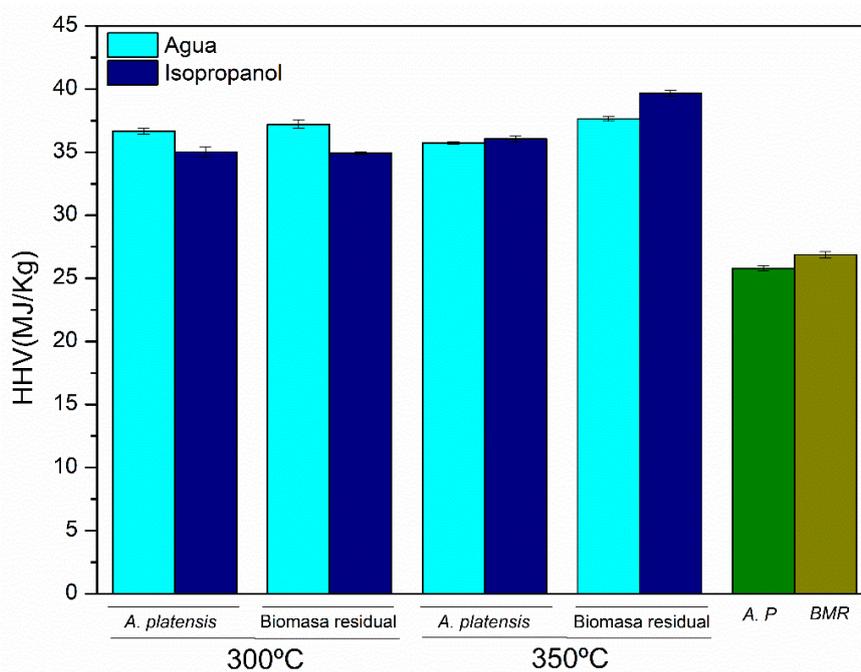


Figura 95. Poder calorífico (HHV) en MJ/kg de los bioaceites obtenidos a 300°C y 350°C con agua e isopropanol a partir de las dos biomásas de estudio y de la microalga entera (AP) y la biomasa residual (BMR).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de HHV de los bioaceites obtenidos fueron mayores con respecto a la biomasa inicial tanto para *A. platensis* (25,8 MJ/kg) como para la biomasa residual (26,9 MJ/kg), debido al descenso del contenido en O y el incremento en H en los bioaceites. El poder calorífico superior (HHV) para los bioaceites producidos mediante *A. platensis* se encuentra en el rango publicado por otros estudios [457] para 350°C. La presencia de alcoholes en el proceso de HTL para la biomasa residual, aumentó los rendimientos a bioaceite y los contenidos de C y H en comparación con los bioaceites producidos por la biomasa completa, siendo esto responsable del incremento del poder calorífico [458].

Como conclusión, las condiciones en las que se generó un bioaceite con los mejores rendimientos y características fue a 350°C, 30 minutos de reacción y con la presencia de isopropanol (50% v/v).

Con el fin de determinar la composición del bioaceite, se empleó la técnica GC-MS (descrita en el apartado 3.2.4). Debido a la complejidad de su composición, los compuestos se agruparon en los siguientes tipos: hidrocarburos (lineales o ramificados), ciclos N, ácidos orgánicos, cetonas y alcoholes, aminas y amidas, y nitrilos. Los resultados mostrados en la figura 96, muestran cantidades importantes de compuestos de nitrógeno en los aceites (20-78%), que corresponden principalmente a aminas y amidas que provienen de las reacciones de hidrólisis, descarboxilación y desaminación de los aminoácidos que forman parte de las proteínas presentes en las microalgas.

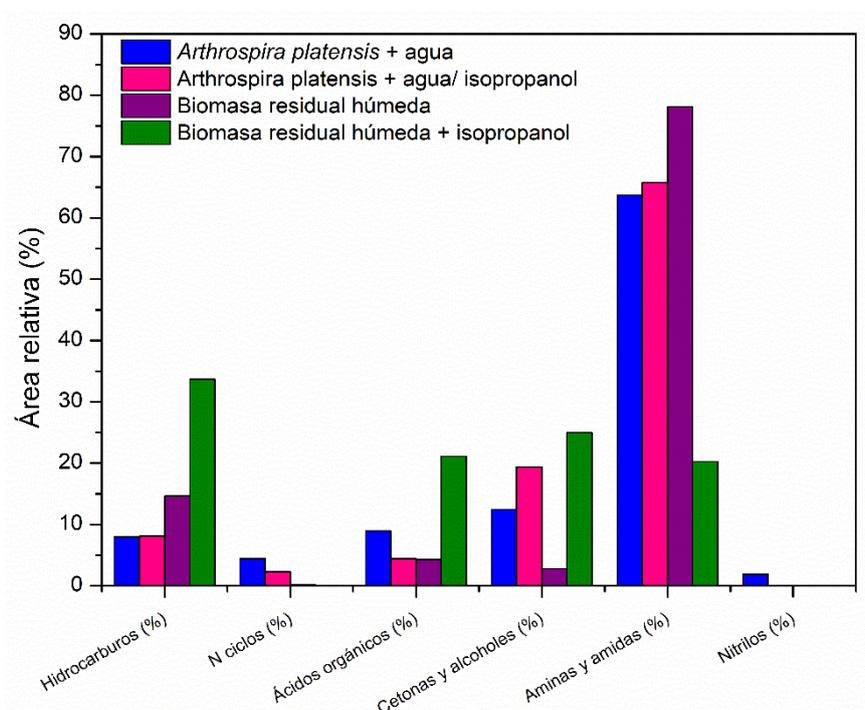


Figura 96. Composición química de los bioaceites tras el proceso de HTL para la temperatura de 350°C y 30 minutos para las biomásas de *Arthrospira platensis* y la biomasa residual húmeda.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, el contenido en hidrocarburos (mayoritariamente lineales) fue significativamente más elevado para la biomasa residual en presencia de isopropanol (33,7%), seguido de la biomasa residual húmeda (14,6%) y de la biomasa completa, que tiene una concentración en hidrocarburos mucho menor (<10%), lo que puede deberse a la menor concentración de lípidos en dicha biomasa (tabla 9). Desde el punto de vista de su empleo como combustible, un elevado contenido de hidrocarburos sería positivo ya que estos compuestos forman parte de la composición de los combustibles de origen fósil empleados actualmente, por lo que no sería necesario transformarlos.

Con respecto a los ácidos orgánicos, éstos se generan principalmente durante la hidrólisis de lípidos y la hidrólisis y desaminación de proteínas. El aumento de ácidos orgánicos observado en el bioaceite obtenido con isopropanol a partir de la biomasa residual, significa que los lípidos se pueden extraer de forma más efectiva (ya que esa biomasa previamente ha sido tratada con ultrasonidos) en presencia de este disolvente, y se hidrolizan para formar ácidos orgánicos. Además, el contenido de aminas y amidas disminuyó en este bioaceite usando isopropanol, ya que este disolvente promueve las reacciones de desaminación de las proteínas.

❖ Caracterización de la fase acuosa

El análisis elemental de las fases acuosas obtenidas en los distintos procesos de HTL llevados a cabo con la biomasa completa y con la biomasa residual a 300°C y 350°C, se presentan en las tablas 31 y 32, respectivamente. Se puede observar que el contenido en C disminuyó en las fases acuosas, a ambas temperaturas, alcanzando valores similares. Estas cantidades relativamente bajas de C en la fase acuosa se deben a la descomposición de las macromoléculas en otras más pequeñas que son solubles en agua. Aun así los contenidos de C y N de estas fases hacen que puedan resultar interesantes para su reutilización en los cultivos de microalgas [459]. Sin embargo, el contenido en los heteroátomos (N y O) de estas fases fue relativamente más elevado en comparación con el del bioaceite. Principalmente, esto se debe a la hidrólisis de carbohidratos y proteínas y la posterior descarboxilación y desaminación de los mismos que produce compuestos de N y O solubles en medios acuosos [456,460].

Tabla 31. Análisis elemental (% p/p. bs) de las fases acuosas generadas a 300°C y 30 minutos para las dos biombras: *Arthrospira platensis* y biomasa residual húmeda (BMR).

Biomasa + disolvente	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	O (%)
<i>A. platensis</i> + agua	48,7 ± 0,5	7,16 ± 0,02	10,0 ± 0,3	0,670 ± 0,001	33,5 ± 0,8
<i>A. platensis</i> + isopropanol	43,1 ± 0,6	6,84 ± 0,07	10,3 ± 0,1	0,84 ± 0,06	38,9 ± 0,5
BMR + agua	39,9 ± 0,3	7,72 ± 0,02	16,2 ± 0,1	4,7 ± 0,3	31,4 ± 0,3
BMR + metanol	40,08 ± 0,03	9,49 ± 0,06	12,2 ± 0,2	2,5 ± 0,5	35,7 ± 0,4
BMR + etanol	41,0 ± 0,1	8,56 ± 0,04	14,1 ± 0,1	3,8 ± 0,4	32,5 ± 1,0
BMR + isopropanol	40,3 ± 0,1	7,9 ± 0,1	15,73 ± 0,03	5,1 ± 0,2	31,0 ± 0,5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 32. Análisis elemental (% p/p. bs) de las fases acuosas generadas a 350°C y 30 minutos para las dos biombras: *Arthrospira platensis* y biomasa residual húmeda (BMR).

Biomasa + disolvente	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	O (%)
<i>A. platensis</i> + agua	48,10 ± 0,08	8,09 ± 0,06	7,01 ± 0,08	0,25 ± 0,01	36,6 ± 0,9
<i>A. platensis</i> + isopropanol	42,9 ± 1,8	6,53 ± 0,08	8,0 ± 0,2	0,910 ± 0,003	41,7 ± 0,5
BMR + agua	47,0 ± 0,5	7,840 ± 0,003	9,2 ± 0,3	2,7 ± 0,1	33,69 ± 0,09
BMR + isopropanol	34,7 ± 0,6	9,24 ± 0,01	15,1 ± 0,4	8,9 ± 0,3	32,2 ± 0,2

Se puede observar que, para el caso de la biomasa residual el contenido en N es mayor tanto a 300°C como a 350°C, en comparación con la biomasa inicial. Esto puede ser porque esta biomasa ha sido previamente tratada con ultrasonidos, por ello, su pared celular estará más debilitada y las proteínas más accesibles, por ende, el contenido en N será mayor debido a la posterior desaminación de las mismas que produce compuestos de N solubles en agua. El contenido en N también aumenta al utilizar cosolventes, tanto para la biomasa completa como para la biomasa residual.

Para todos los casos, el contenido en S de las fases acuosas aumentó en gran medida con respecto al contenido en S de los bioaceites. Este S probablemente proviene de la descomposición de proteínas con aminoácidos que contienen azufre y la ciclación de éstos [461]. Watson y colaboradores [462] también encontraron que más del 70% del S en la microalga *Nannochloropsis* sp. se recuperó en la fase acuosa, lo que sugiere la mayor solubilidad de estos compuestos de azufre en la fase acuosa.

❖ Caracterización del residuo sólido

Es la fase que presenta menores rendimientos, tanto para 300°C como para 350°C ($3,7 \pm 1,4$ y $1,1 \pm 0,1$ % p/p, bs, respectivamente). Esta fracción se compone principalmente de cenizas, compuestos ricos en carbono y ciertos elementos minoritarios como Ca, Fe, K, Mg, Na y P, entre otros. En general, el rendimiento a residuo sólido disminuyó con el aumento de la temperatura de reacción. Al tener bajos rendimientos resulta complicado determinar el análisis elemental de todos los sólidos. Sin embargo, se pudo determinar la composición elemental de alguno de ellos a 300°C como, por ejemplo: de la biomasa completa + agua y de la biomasa residual húmeda. Presentaron proporciones de a 36-40% p/p, bs (C), 6% p/p, bs (H), 6-11% p/p, bs (N), 0,6-11% p/p, bs (S) y 30-50% p/p, bs (O). Como el residuo sólido tiene un contenido en carbono considerable, junto con un contenido relativamente elevado en N y azufre, puede ser utilizado como fertilizante [452].

4.6.3. Digestión anaerobia

Otra de las opciones de revalorizar la biomasa residual obtenida tras la extracción de PC fue mediante un proceso de digestión anaerobia (DA), incluido en el esquema de biorrefinería 2. Se ha estudiado la producción de metano tanto en condiciones mesofílicas (37°C) como termofílicas (55°C). Como control se ha analizado la DA de la biomasa de *Arthrospira platensis*. Por otro lado, para ambas temperaturas, también se ha analizado el efecto de la adición de un cosustrato como el glicerol ya que las relaciones C/N para la microalga entera y para la biomasa residual fueron muy bajas: 4,3 y 5,3, respectivamente.

❖ Condiciones mesofílicas

Los ensayos de biogás en condiciones mesofílicas para *A. platensis* y para la biomasa residual se prolongaron hasta los 39 días, a fin de asegurar la completa biometanización; sin embargo, los ensayos de ambas biomásas con la presencia de glicerol como cosustrato, se mantuvieron hasta el día 31 (figura 97). Los mayores valores de producción de metano (BMP) tanto para el caso de no usar cosustrato como en el caso de usarlo se obtuvieron para la biomasa completa de *A. platensis* (322 mL CH₄/gSV y 452 mL CH₄/gSV, respectivamente). Dichos valores son próximos a los obtenidos en bibliografía [463–465]. Con respecto a la biomasa residual se observa que los valores máximos de BMP se obtienen cuando se utilizaba cosustrato (300 mL CH₄/gSV) valor muy próximo al que se obtenía con la biomasa completa (322 mL CH₄/gSV), pero se consiguió reducir el tiempo de la digestión anaerobia en 10 días, lo cual resultó muy interesante.

El hecho de adicionar un cosustrato rico en C como es el glicerol supuso un aumento en la producción de biometano del 40,3% y del 10,88% para el caso de *A. platensis* y de la biomasa residual, respectivamente.

Cabría esperar que las mayores BMP se obtuvieran con la biomasa residual, ya que:

1. Es la biomasa con mayor contenido lipídico (tabla 28).
2. La producción de metano está fuertemente influenciada por la pared celular de las microalgas, que puede impedir la degradación anaerobia de la materia orgánica por los microorganismos. Por ello, la pared celular de la biomasa residual que ha sido previamente tratada con ultrasonidos haría que presente una mejor biodegradabilidad y accesibilidad a la materia orgánica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

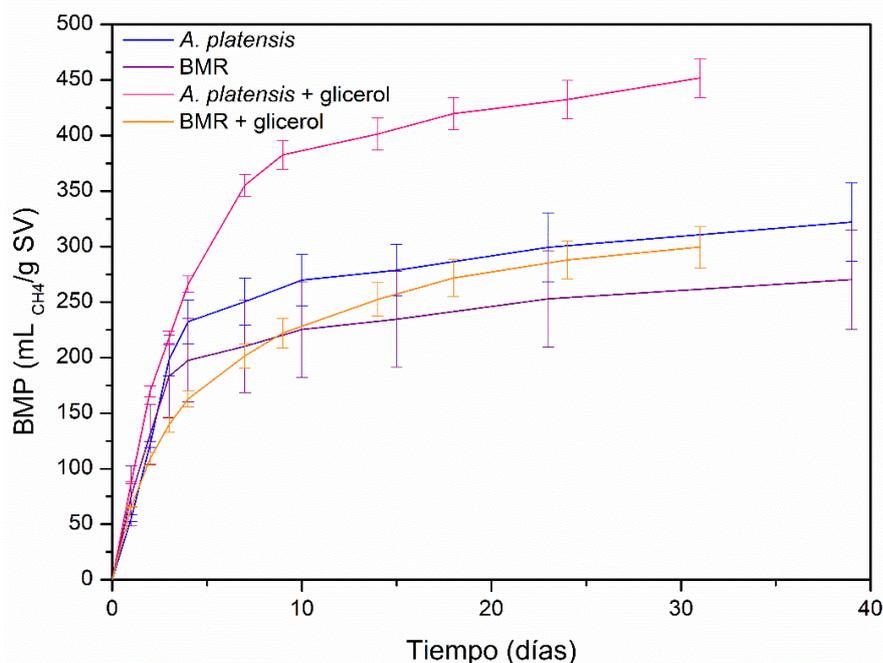


Figura 97. Producción de metano en condiciones mesofílicas a partir de *Arthrospira platensis* y de la biomasa residual húmeda en presencia y ausencia de glicerol como cosustrato.

Como se puede observar, se han obtenido valores relativamente cercanos de BMP para la biomasa completa y para la biomasa residual húmeda (322 y 270 mL CH₄/gSV, respectivamente), aunque los valores de BMP para la biomasa completa fueron algo mayores.

Los lípidos son los componentes orgánicos que producen una mayor cantidad de metano, seguidos de las proteínas y, por último, de los carbohidratos [374]. Esta reducción de BMP observada para la BMR se debe a que esta biomasa procedía de la extracción de proteínas y ficobiliproteínas y por ello, se han eliminado una gran parte de proteínas de esta biomasa (~50%), reduciendo así los componentes que presentan un gran potencial para la producción de metano. Con respecto a los lípidos, la microalga de partida no tenía un alto contenido lipídico y aunque en la biomasa residual se duplicara dicho contenido, éste seguía siendo bajo. Por lo que a pesar de que la biomasa residual poseía un mayor contenido lipídico, al presentar un menor contenido proteico, hizo que se produjeran menores valores netos de BMP para la biomasa residual que para la biomasa completa.

Con respecto a la biodegradabilidad, que depende en gran medida de la pared celular; cabe destacar que la biomasa de *A. platensis* no es biomasa fresca que presente una pared celular intacta, sino que se trata de biomasa previamente liofilizada; por ese motivo, no se apreciaba un aumento en la biodegradabilidad de la biomasa residual con respecto a la microalga de partida, ya que ambas biomasa estaban previamente tratadas.

La integración de glicerol en la digestión anaerobia de la biomasa residual de *A. platensis*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

obtenida después del proceso de extracción de PC tuvo el potencial de mejorar el proceso de DA y aumentó la producción de metano hasta el 11% tal y como también publicaron Ehimen y colaboradores [379].

Como conclusión, con la biomasa residual + cosustrato, en condiciones mesofílicas, se han obtenido valores BMP (300 mL CH₄/gSV) próximos a los de la biomasa completa (322 mL CH₄/gSV), lo cual fue un resultado prometedor ya que con una biomasa que se consideraba “residuo” se generó prácticamente el mismo metano que con la biomasa de *A. platensis* completa.

Análisis iniciales y finales (DQO, nitrógeno total, amonio y fosfatos)

En las tablas 33 y 34, se presenta el análisis tanto inicial como el del residuo de los ensayos de BMP de la biomasa completa y de la biomasa residual sin y con cosustrato.

Tabla 33. Contenido en fosfatos, amonio, nitrógeno total y demanda química de oxígeno (DQO) de las biombras iniciales de la DA empleando biomasa completa de *Arthrospira platensis* y biomasa residual en presencia o no de cosustrato. Condiciones mesofílicas

mg/L	Fosfatos	Amonio	Nitrógeno T	DQO
<i>A. platensis</i>	179 ± 6	19 ± 9	19 ± 2	412 ± 23
Biomasa residual	723 ± 12	16 ± 1	94 ± 2	1932 ± 6
<i>A. platensis</i> + glicerol	51 ± 5	73 ± 17	22 ± 3	1289 ± 20
Biomasa residual + glicerol	456 ± 14	46 ± 8	79 ± 5	1875 ± 24

El contenido en fósforo es crucial para proporcionar, ATP y NADP, las moléculas portadoras de energía durante el metabolismo [466]. Por ello una reducción en la concentración de fosfatos en el digestato indica una mayor asimilación de éste por parte de los microorganismos. En el presente trabajo se tienen reducciones de hasta el 47% en fosfato para el caso de *A. platensis* y del 41% para el caso de la biomasa residual. Sin embargo, la presencia de glicerol afecta a la concentración de fosfatos haciendo que los microorganismos la asimilen en menor medida, ya que para la microalga completa solo se reduce en un 25% mientras que para la biomasa residual prácticamente se mantiene constante.

Tabla 34. Contenido en fosfatos, amonio, nitrógeno total y demanda química de oxígeno (DQO) de los digestatos de la DA empleando biomasa completa de *Arthrospira platensis* y biomasa residual en presencia o no de cosustrato. Condiciones mesofílicas

mg/L	Fosfatos	Amonio	Nitrógeno T	DQO
<i>A. platensis</i>	94 ± 23	298 ± 18	137 ± 1	138 ± 22
Biomasa residual	425 ± 28	127 ± 4	156 ± 5	1899 ± 24
<i>A. platensis</i> + glicerol	38 ± 4	239 ± 17	128 ± 7	9 ± 2
Biomasa residual + glicerol	480 ± 24	90 ± 26	80 ± 18	1454 ± 49

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El amonio es beneficioso para el proceso de DA ya que el nitrógeno es el nutriente esencial de los microorganismos que intervienen en el proceso. Sin embargo, por encima de una concentración de 200 mg/L el amonio puede tener un efecto inhibitorio, afectando de forma negativa a la producción de metano [467]. Como se puede apreciar, todas las concentraciones de amonio, al inicio del experimento fueron menores de 200 mg/L, sin embargo, al final del proceso se observa, para todos los casos, un aumento en la concentración de amonio. Aunque únicamente fue para la cianobacteria de partida con la que se superaron las concentraciones de amonio, esto indica que hubo inhibición por parte de éste. Por el contrario, para la biomasa residual los niveles de amonio se mantuvieron por debajo de 200 mg/L, por lo que la menor producción de metano por parte de esta biomasa no se debió a una inhibición por amonio. Tampoco se debió a que la biomasa sea menos accesible por tener una pared celular más resistente, puesto que esta biomasa se obtuvo tras un tratamiento con ultrasonidos. Esa reducción en la producción de metano se debió exclusivamente a la reducción significativa en el contenido de proteínas de dicha biomasa, que son uno de los potenciadores para la producción de metano.

La concentración de nitrógeno total inicial se aprecia mucho más elevada para la biomasa residual que para la microalga entera, con y sin cosustrato. En principio teniendo en cuenta las relaciones C/N obtenidas para la biomasa completa y para la biomasa residual (4,3 y 5,3, respectivamente), cabría esperar que el mayor contenido en nitrógeno total lo tuviera la biomasa completa de *A. platensis*, ya que contiene todas las proteínas. Sin embargo, según la tabla 33, el contenido en nitrógeno total inicial más elevado lo presentó la biomasa residual. Esto puede deberse a que después del pretratamiento con ultrasonidos la pared celular pudo estar aún más debilitada, haciendo que el nitrógeno estuviera mucho más accesible.

Por último, la DQO en la DA es una medida indirecta de la materia orgánica a biodegradar. De igual forma en que sucedía con el nitrógeno, se observa una mayor DQO para la biomasa residual, ya que la materia orgánica estaba mucho más expuesta que para la *A. platensis*. A partir de la concentración de DQO final se pudo evaluar la eficiencia de la producción de metano. Acorde con esto, las menores DQO del residuo de DA (tabla 34) se obtuvieron con la microalga completa, que fueron las que produjeron mayor cantidad de metano. De igual forma, comparando los análisis sin presencia de glicerol con los análisis con la presencia de glicerol, se puede observar que en el digestato se han obtenido valores inferiores de DQO utilizando cosustrato, ya que los experimentos con glicerol son los que mayor cantidad de metano produjeron. Todo lo mencionado anteriormente se representa de forma gráfica en la figura 98.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

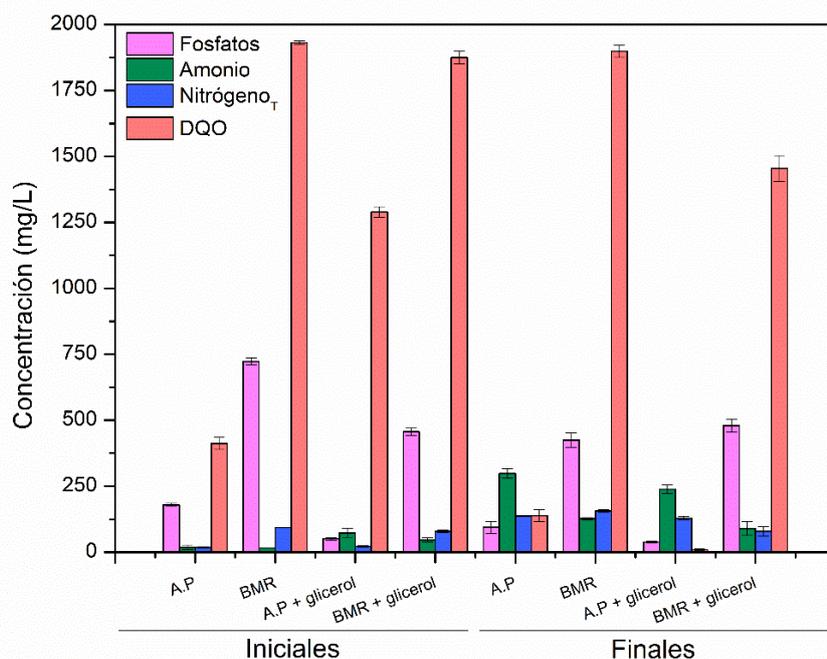


Figura 98. Contenido inicial y de los residuos de la BMP en fosfatos, amonio, nitrógeno total y demanda química de oxígeno (DQO) para *Arthrospira platensis* (A.P), biomasa residual (BMR), A.P + glicerol y BMR + glicerol.

❖ Condiciones termofílicas

De igual forma, los experimentos en condiciones termofílicas se mantuvieron hasta el día 33 (figura 99). El objetivo de emplear estas condiciones fue producir o más biometano o aproximadamente el mismo que en condiciones mesofílicas, pero en un menor tiempo, ya que al aumentar la temperatura aumenta la constante cinética y es posible generar biogás más rápidamente, aunque esto es algo específico de cada especie de microalgas [468].

Las mayores producciones de metano, tanto en presencia como en ausencia de cosustrato, se obtuvieron para la biomasa completa de *A. platensis* (329 mL CH₄/gSV y 294 mL CH₄/gSV, respectivamente) valores relativamente próximos a los obtenidos en bibliografía en condiciones termofílicas [463]. De igual forma que en el estudio de El-Mashad [463], los valores de BMP obtenidos para *A. platensis* fueron similares a 37 y a 55°C, 322 y 329 mL CH₄/gSV, respectivamente. Esto es debido a que la temperatura a la que se lleva a cabo la digestión anaerobia puede tener dos efectos: por un lado, la mejora de la eficiencia de la hidrólisis enzimática y la tasa de crecimiento de metanógenos, con lo que se puede reducir el tiempo de producción de metano. Y, por otro lado, los altos niveles de amoníaco y ácidos grasos volátiles (AGV) que repercute negativamente en la producción de metano [468]. No obstante, como se observa en la gráfica 99, tanto para la microalga de partida como para la biomasa residual, se han obtenido valores de BMP inferiores que en condiciones mesofílicas. Esto fue debido a que el rango de temperaturas más alto está asociado con altos niveles de amoníaco y ácidos grasos volátiles (AGV) que, a su vez, están relacionados con la falla del proceso debido a la posible inhibición de los metanógenos por

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

parte de estos compuestos [468,469]. Tanto la concentración de amonio, como de fosfatos, DQO y nitrógeno total se han discutido más adelante en las tablas 35 (análisis iniciales) y 36 (análisis del residuo).

Con respecto a la biomasa residual, se observa que los valores máximos de BMP se obtienen cuando se utiliza cosustrato (171 mL CH₄/gSV), al igual que para la biomasa completa, mucho menor que el que se obtenía en condiciones mesofílicas (300 mL CH₄/gSV).

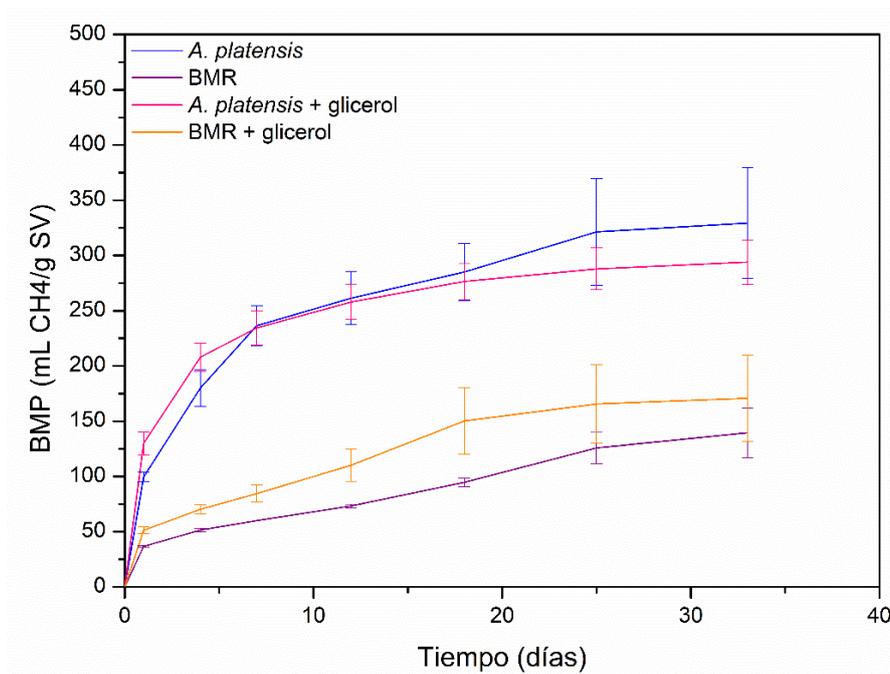


Figura 99. Producción de metano en condiciones termofílicas a partir de *Arthrospira platensis* y la biomasa residual húmeda en presencia y ausencia de glicerol como cosustrato.

Análisis iniciales y finales (DQO, nitrógeno total, amonio y fosfatos)

En las tablas 35 y 36, se presenta el análisis inicial y el del digestato, cuando se emplea la biomasa completa y la biomasa residual sin y con cosustrato.

Tabla 35. Contenido en fosfatos, amonio, nitrógeno total y demanda química de oxígeno (DQO) de las biombras iniciales de la DA a partir de la (biomasa completa de *Arthrospira platensis* y biomasa residual) en presencia o no de cosustrato. Condiciones termofílicas

mg/L	Fosfatos	Amonio	Nitrógeno T	DQO
<i>A. platensis</i>	168 ± 22	67 ± 5	126 ± 14	1785 ± 7
Biomasa residual	274 ± 20	6 ± 3	131 ± 3	1801 ± 14
<i>A. platensis</i> + glicerol	143 ± 12	11 ± 5	14 ± 8	1790 ± 8
Biomasa residual + glicerol	239 ± 13	6 ± 2	117 ± 7	1871 ± 8

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha mencionado el contenido en fosfatos es crucial para proporcionar los portadores de energía, ATP y NADP, durante el metabolismo [466]. Por ello una reducción en la concentración de fosfatos del residuo másico indica una mayor asimilación de éste por parte de los microorganismos. Sin embargo, en condiciones termofílicas la concentración de fosfatos no se reduce para ningún caso, sino que aumenta, sobre todo para la biomasa residual + glicerol. Este aumento significa que los microorganismos asimilan el fosfato en menor medida que para condiciones mesofílicas.

Tabla 36. Contenido en fosfatos, amonio, nitrógeno total y demanda química de oxígeno (DQO) en el digestato de la DA a partir de la biomasa completa de *Arthrospira platensis* y de la biomasa residual, en presencia o no de cosustrato. Condiciones termofílicas

mg/L	Fosfatos	Amonio	Nitrógeno T	DQO
<i>A. platensis</i>	170 ± 2	545 ± 11	224 ± 0,1	809 ± 3
Biomasa residual	336 ± 5	106 ± 19	276 ± 1	1049 ± 35
<i>A. platensis</i> + glicerol	170 ± 9	499 ± 8	193 ± 4	874 ± 38
Biomasa residual + glicerol	452 ± 6	189 ± 9	225 ± 13	1079 ± 10

Al igual que en condiciones mesofílicas, al inicio, todas las concentraciones de amonio fueron menores de 200 mg/L; sin embargo, al final del proceso se observó para todos los casos un aumento en la concentración de amonio, sobre todo para la microalga de partida donde se superaron los 200 mg/L por lo que para esta biomasa hubo inhibición por parte de éste. Sin embargo, para la biomasa residual los niveles de amonio se han mantenido por debajo de 200 mg/L, por lo que la menor producción de metano por parte de esta biomasa no se debió a una inhibición por amonio, sino que puede deberse a los altos niveles de ácidos grasos volátiles (AGV) producidos en condiciones termófilas, que están relacionados con la posible inhibición de los metanógenos por parte de estos compuestos [468,469].

Respecto a la concentración de nitrógeno total inicial se apreció que era mucho más elevada para la biomasa residual que para la microalga completa, con y sin cosustrato. De igual forma que en las condiciones mesofílicas esto se pudo deber a que después del pretratamiento con ultrasonidos la pared celular pudo estar aún más debilitada, haciendo que el nitrógeno estuviera más accesible.

Tanto para la biomasa completa como para la residual se han observado valores de DQO iniciales próximos que podrían dar lugar a una producción de metano similar. Sin embargo, evaluando el digestato obtenido, los menores valores de DQO (tabla 36) se obtuvieron con la microalga completa, que son las que produjeron mayor cantidad de metano. Sin embargo, los valores de DQO para el digestato de la biomasa residual también se han reducido, aunque en menor medida que las de la biomasa completa, debido a que el proceso de DA se ve inhibido en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mayor grado para la biomasa residual. Para poder observar de forma más visual todo lo mencionado anteriormente, se presenta la figura 100.

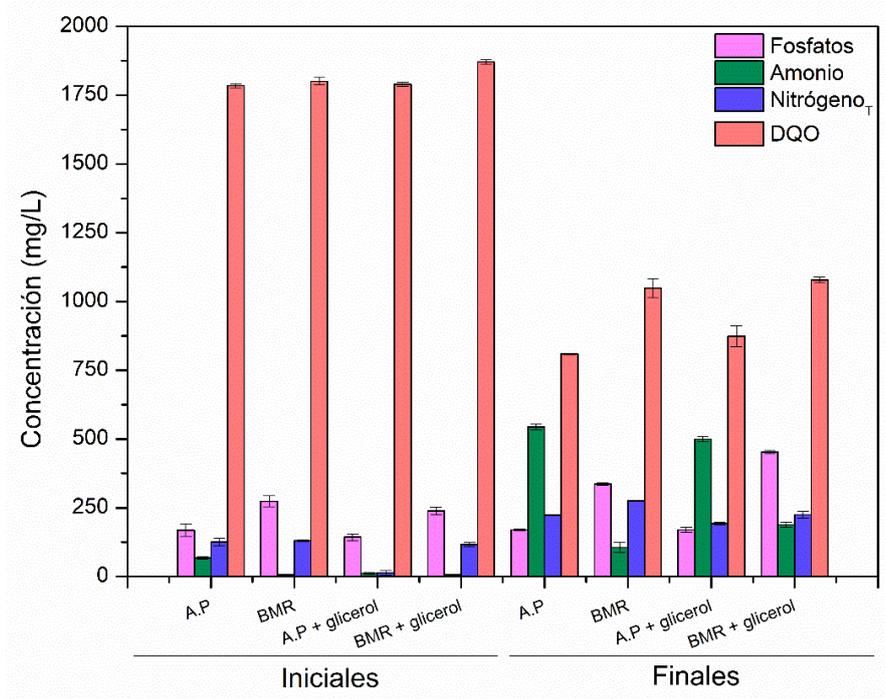


Figura 100. Contenido inicial y de los residuos de la BMP en fosfatos, amonio, nitrógeno total y demanda química de oxígeno (DQO) para *Arthrospira platensis* (A.P), biomasa residual (BMR), A.P + glicerol y BMR + glicerol.

4.7. Análisis del ciclo de vida de los procesos

4.7.1. Definición del objetivo y alcance

Para establecer el alcance del estudio se tuvieron en cuenta las diferentes etapas para realizar el Análisis del ciclo de vida (ACV), comentadas anteriormente en el *apartado 3.5*:

Objetivo: la principal finalidad de este estudio es la determinación de los principales impactos medioambientales implicados en las diversas etapas del proceso de extracción y purificación de ficocianina y del aprovechamiento de la biomasa residual resultante mediante HTL o digestión anaerobia. Para la realización correcta del ACV es fundamental tener bien descrito tanto la unidad funcional como los límites del sistema (ver *apartado 3.5*).

a) Unidad funcional: se ha decidido establecer una unidad funcional, de tipo físico, consistente en la producción de 100 gramos de ficocianina.

b) Límites del sistema: en las figuras 58 y 59 mostradas en el *apartado 3.5* se muestran todas las etapas del proceso que quedan incluidas en el sistema y que, en consecuencia, son las que van a ser estudiadas en el ACV. Se ha tenido en cuenta desde el cultivo de la microalga hasta la obtención de la ficocianina ya purificada, así como la producción de un bioaceite o de un biogás a partir de la biomasa residual; incluyendo todos los procesos intermedios para la obtención de los productos finales. El transporte, la gestión de residuos y todos los equipos utilizados quedan excluidos de los límites del sistema.

4.7.2. Análisis de inventario

Una vez realizada la definición de objetivos y el alcance de estudio se debe realizar el análisis de inventario siguiendo la normativa UNE EN ISO 14040 y 14044 [413]. Para ello se realiza la identificación y cuantificación de las entradas y salidas del proceso, tanto de materia como de energía. En el caso de la presente tesis doctoral, las entradas se corresponden con el consumo de recursos que supone la realización del proceso y las salidas con las emisiones a la atmósfera o con la generación de residuos. Dicha cuantificación se ha realizado, como ya se ha mencionado anteriormente, realizando la simulación de todas las etapas implicadas en el proceso mediante el software comercial SuperPro Designer 9.5. Como en el presente trabajo se han planteado dos esquemas de biorrefinería, se han realizado dos simulaciones distintas, modificando el aprovechamiento de la biomasa residual obtenida, mediante: HTL, produciendo un bioaceite, o digestión anaerobia, obteniendo biogás.

Como ambas biorrefinerías son extensas, para facilitar el seguimiento de las mismas se va a elaborar el análisis de inventario por etapas del proceso: cultivo, secado/lioofilización, extracción de ficocianina, purificación de ficocianina y aprovechamiento de la biomasa residual.

❖ **Cultivo y secado (liofilización)**

Tal y como se observa en la figura 101, se puede ver el esquema correspondiente a la etapa de cultivo del proceso. El cultivo de la microalga *Arthrospira platensis* se lleva a cabo en sistemas abiertos, tipo “raceway ponds” (P-10/RP-101-*Algae Growth*), seguido de una centrifugación (P-1/DC-101-*Centrifugation*) de la biomasa microalgal obtenida junto con el proceso de secado/liofilización (P-6/ FDR-101-*Freeze Drying*). Como se puede apreciar hay dos corrientes de entrada (*Nutrients* y *Air-1*) que están compuestas por agua, aire y los nutrientes necesarios (NaH_2PO_4 y NaNO_3) para el crecimiento de la microalga. Por otro lado, se obtienen tres corrientes de salida: la primera de ellas va directamente al siguiente proceso (extracción de PC, S-114) con la biomasa cultivada ya sin agua y con muy pocos nutrientes; la corriente *Outlet gas*, que se emite directamente a la atmósfera y contiene dióxido de carbono, nitrógeno y oxígeno y la corriente *water + nutrients* en la que se elimina prácticamente la totalidad del agua (99,99%) y contiene los nutrientes restantes.

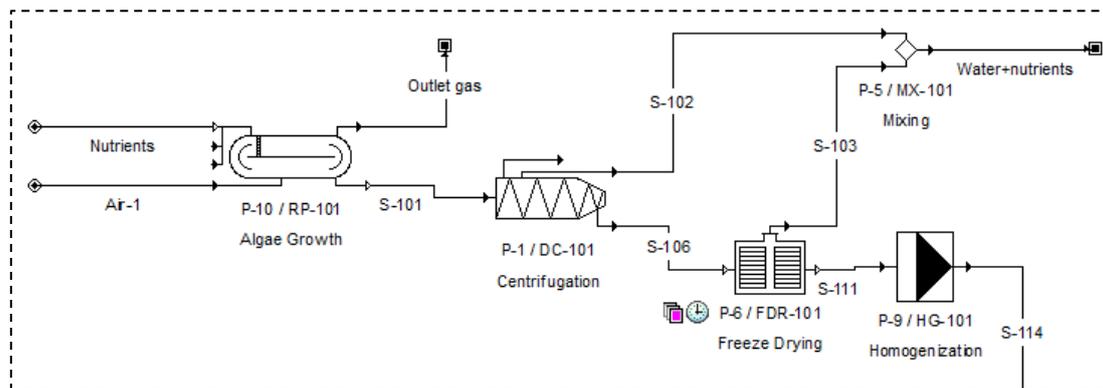


Figura 101. Diagrama de la etapa de cultivo y secado (liofilización).

Las condiciones de operación a las se trabaja en la etapa de cultivo son 25°C y 1 bar de presión. Una de las etapas más relevantes del sistema es la centrifugación de la biomasa obtenida en la etapa de cultivo (ya que en ella se elimina el 99% de agua) para poder secarla y liofilizarla. El motivo de que sea tan necesaria es porque la extracción de ficocianina se realiza a partir de biomasa seca. A continuación, en la tabla 37, se detallan los valores obtenidos a través de la simulación en el software SuperPro Designer 9.5 que, posteriormente, serán utilizados para evaluar los impactos ambientales mediante ACV. Todos los datos de las tablas de inventario en cada una de las etapas están referidos a la unidad funcional de 100 gramos de PC producida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 37. Corrientes de entrada principales e intermedias, y corrientes de salida en la etapa de cultivo y secado (liofilización).

Cultivo, secado/liofilización					
Entradas principales					
Nutrients			Air-1		
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)		
CO ₂	15163,37				
NaH ₂ PO ₄	2545,5	Aire	17460121,26		
NaNO ₃	1769,05				
Agua	37975419,89				
Corrientes intermedias					
S-101		S-102		S-106	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Na ₂ HPO ₄	2659,33	Na ₂ HPO ₄	2644,7	Na ₂ HPO ₄	14,63
NaH ₂ PO ₄	297,95	NaH ₂ PO ₄	296,31	NaH ₂ PO ₄	1,64
NaNO ₃	176,73	NaNO ₃	175,76	NaNO ₃	0,97
<i>A. platensis</i>	2135,71	Agua	37671773,84	<i>A. platensis</i>	2135,71
Agua	37974238,65			Agua	302464,81
S-103			S-111		
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)		
			Na ₂ HPO ₄	14,63	
Agua	302464,81		NaH ₂ PO ₄	1,64	
			NaNO ₃	0,97	
			<i>A. platensis</i>	2135,71	
Energía					
Centrífuga <i>P-1</i> +liofilizador			116,62KWh		
Salidas					
Outlet gas		Water + nutrients		S-114	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
CO ₂	11040,89	Na ₂ HPO ₄	2644,7	Biomasa residual	864,75
Nitrógeno	13393971,13	NaH ₂ PO ₄	296,31	Carbohidratos	82,22
Oxígeno	4070496,34	NaNO ₃	175,76	Proteína*	916,64
		Agua	37974238,65	Ficocianina	160,18
				Aloficocianina	36,31
				Ficoeritrina	22,21
				Lípidos	53,39
				Na ₂ HPO ₄	14,63
				NaH ₂ PO ₄	1,64
				NaNO ₃	0,97

*No incluidas ficobiliproteínas.

En la tabla anterior (tabla 37) también se muestran las corrientes intermedias (*S-101*, *S-102*, *S-106*, *S-103* y *S-111*). La *S-101* es la corriente que sale de la etapa de cultivo y entra a la centrífuga, por lo que llevará todavía el agua asociada a la microalga junto con los nutrientes. Las corrientes de salida de la centrífuga son dos: *S-102* y *S-106* (ésta entra directamente a la etapa de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

secado/lioofilización), en la primera, se concentran preferentemente el agua y los nutrientes mientras que, en la segunda, se concentra la biomasa prácticamente seca (con solo un 0,79% de agua). Después de la etapa de secado se generan las corrientes de “salida” *S-103* y *S-111*. La primera de ellas está compuesta por el agua restante que se elimina y la *S-111* estaría compuesta por la biomasa de la microalga *A. platensis* junto con algún resto de nutrientes.

El principal consumo de energía en esta etapa viene dado principalmente por la centrífuga y el liofilizador.

❖ Extracción de ficocianina

Una vez realizado el secado y el proceso de liofilización de la biomasa de la microalga *A. platensis*, se procede a la etapa de extracción de PC. Por un lado, se obtendrá el extracto crudo de PC (corriente *S-108*) que posteriormente se purificará, y, por otro lado, se obtendrá la biomasa residual (corriente *S-110*) que se revalorizará para producir bioaceite, a partir del proceso de licuefacción hidrotérmica, o biogás, a partir de la digestión anaerobia. La extracción en el caso de la presente tesis doctoral se realiza, asistida por ultrasonidos, empleando un LI ([EMIM][EtSO₄]) y utilizando una relación LI/biomasa de 11 (p/p) [131].

Observando la figura 102, se puede ver la etapa de extracción de PC (P-3/V-101-*Blending/Storage*), seguida de la centrifugación (P-4/DC-102-*Centrifugation*) necesaria para separar el extracto crudo de PC de la biomasa residual. Como se puede apreciar hay dos corrientes de entrada (*EmimEtSO4* y *S-114*): la primera de ellas aporta el LI ([EMIM][EtSO₄]) y el agua y la segunda proviene de la etapa de secado y liofilización. Por otro lado, se tienen dos corrientes de salida: una de ellas que va directamente al siguiente proceso (purificación de PC, *S-108*) que contiene la ficobiliproteína de interés, con una pureza de 0,54, junto con el LI; y la corriente *S-110* que contiene la biomasa residual + agua que pasará a revalorizarse en la siguiente etapa: HTL o DA. El esquema de simulación de la etapa de extracción de PC está detallado a continuación en la figura 102:

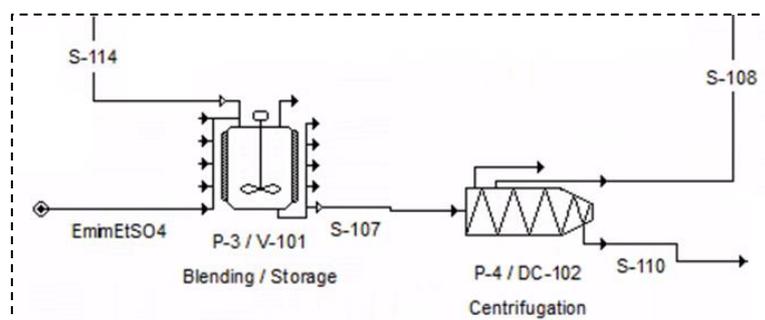


Figura 102. Diagrama de la extracción de ficocianina.

Las condiciones de operación a las se trabaja en la etapa extracción de PC son 25°C y 1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

bar de presión. La centrifugación de la mezcla obtenida en la etapa de extracción es una etapa muy relevante para poder separar el extracto crudo de PC de la biomasa residual resultante, y es la mayor responsable del consumo de energía en esta etapa. Se detallan los valores obtenidos a través de la simulación en el software SuperPro Designer 9.5 en la tabla 38.

Tabla 38. Corrientes de entrada principales e intermedias, y corrientes de salida en la etapa extracción de PC.

Extracción de ficocianina			
Entradas principales			
EmimEtSO ₄		S-114	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
		Biomasa residual	864,75
		Carbohidratos	82,22
		Proteína*	916,64
		Ficocianina	160,18
		Aloficocianina	36,31
		Ficoeritrina	22,21
		Lípidos	53,39
		Na ₂ HPO ₄	14,63
		NaH ₂ PO ₄	1,64
		NaNO ₃	0,97
[EMIM][EtSO ₄]	24808		
Agua	94100		
Corrientes intermedias			
S-107			
Compuesto	Caudal (g/h)		
Biomasa residual	864,75		
Carbohidratos	82,22		
Proteína*	916,64		
Ficocianina	160,18		
Aloficocianina	36,31		
Ficoeritrina	22,21		
[EMIM][EtSO ₄]	24808		
Lípidos	53,39		
Na ₂ HPO ₄	14,63		
NaH ₂ PO ₄	1,64		
NaNO ₃	0,97		
Agua	94100		
Energía			
Centrífuga P-4			8,68KWh
Salidas			
S-108		S-110	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	15,68	Biomasa residual	864,75
Proteína*	731,67	Carbohidratos	66,54
Ficocianina	131,19	Proteína*	184,98
Aloficocianina	18,43	Ficocianina	28,99
Ficoeritrina	13,01	Aloficocianina	17,87

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

[EMIM][EtSO ₄]	24807,98	Ficoeritrina	9,2
Lípidos	11,44	[EMIM][EtSO ₄]	0,02
Na ₂ HPO ₄	14,63	Lípidos	41,95
NaH ₂ PO ₄	1,64	Na ₂ HPO ₄	0
NaNO ₃	0,97	NaH ₂ PO ₄	0
Agua	64806,67	NaNO ₃	0
		Agua	29293,33

*No incluidas ficobiliproteínas.

En la tabla anterior (tabla 38), aparte de las corrientes de entrada y salida, también se muestra la corriente intermedia (*S-107*). Esta es la corriente que sale de la etapa de extracción de PC y entra a la centrífuga, por lo que es una mezcla compuesta por LI + biomasa + agua. Con respecto a las corrientes de salida de la centrífuga, en la *S-108* (entra directamente a la etapa de purificación de PC) se concentran preferentemente el agua, las proteínas y la ficocianina y en la *S-110* (que irá a la a la etapa de HTL o de DA, según el esquema de biorrefinería que se considere) se concentra la biomasa residual, rica en lípidos y carbohidratos.

❖ Separación y purificación de ficocianina

Una vez obtenido el extracto crudo de ficocianina (corriente *S-108*) se procede a la separación y purificación de dicha ficobiliproteína en tres etapas: separación mediante un sistema de dos fases acuosas (ATPS), diálisis para recuperar el LI y para purificar la PC y precipitación en dos etapas.

Se detallan los valores de la simulación obtenidos en esta etapa en la tabla 39. Para mayor claridad de los datos, aunque dicha tabla está referida a los resultados obtenidos en el proceso de separación y purificación de PC completo, se han subclasificado dichos resultados a su vez, en las tres etapas de este proceso: ATPS, diálisis y precipitación (1° y 2° precipitación).

1. **ATPS:** para llevar a cabo este proceso, se introduce la corriente que proviene de la extracción de PC (*S-108*) en un sistema ATPS (P-20/V-104-*Blending/Storage*) que ya contiene, la correspondiente sal: fosfato dipotásico (K₂HPO₄), el LI ([EMIM][EtSO₄]) y agua, preparado en las proporciones adecuadas para que se forme el sistema bifásico y pueda llevarse a cabo la separación de PC. Para la elaboración de este sistema es necesario que el pH esté ajustado a 6,5-7 y también se debe controlar la temperatura a 25°C. En primer lugar, se procede a la homogeneización de la mezcla de extracto crudo + ATPS. A continuación, se deja decantar (P-8/V-105-*Decanting*) hasta que se forma el sistema de dos fases acuosas, obteniendo dos corrientes una de ellas (*TOP phase*) rica en LI y PC y la otra (*BOTTOM phase*) rica en sal (figura 103).

2. **Diálisis:** la corriente que procede del sistema ATPS (*TOP phase*) que contiene la ficocianina ya separada de lípidos y carbohidratos, se somete a un proceso de diálisis para separar el LI de la PC, empleando una membrana de diálisis (P-21/DF-101-*Diafiltration*) [470]. Las

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

condiciones en las que se lleva a cabo la diálisis son 25°C y 1 bar de presión y se dejará dializar dicha fase superior durante 4 horas. Como resultado de esta operación se recupera más del 95% de LI y más del 90% de PC con una pureza de 2,4. El esquema de simulación de esta etapa se muestra también en la figura 103. De igual forma que para el ATPS, los valores obtenidos en esta etapa mediante la simulación se muestran en la tabla 39.

3. **Precipitación:** es el último proceso que se lleva a cabo dentro de la etapa de separación y purificación de PC. En él se realiza la mezcla de la corriente *S-136* (procedente del proceso de diálisis mediante el cual ya se ha eliminado el LI y se ha purificado la PC) con una corriente que contiene sulfato de amonio (*Sulfate-1*). La relación extracto/sal en esta primera precipitación es de 9 (p/p). Esta mezcla se lleva a cabo en el mezclador (P-23/V-106-*Blending/Storage*) a 25°C y se agita durante 1 hora. A continuación, la mezcla resultante (*S-117*) se centrifuga (P-2/DC-103-*Centrifugation*) por lo que se generan dos corrientes (*S-130* y *waste-1*). La primera de ellas es el sobrenadante resultante, rico en PC, que se mezclará de nuevo con una nueva corriente de sulfato de amonio (*Sulfate-2*) en el mezclador (P-25/V-108-*Blending/Storage*), mientras que la segunda de ellas es un precipitado formado por otras proteínas e impurezas.

La segunda precipitación se lleva a cabo de forma similar a la primera, aumentando la cantidad de sulfato de amonio añadida y, disminuyendo por tanto la relación extracto/sal a 5 (p/p). En ella, como ya se ha mencionado, se mezclarán la corriente derivada de la primera precipitación *S-130* con la corriente *sulfate-2* que contiene el sulfato de amonio, en el mezclador (P-25/V-108-*Blending/Storage*) a 25°C, durante 1 hora. A continuación, la mezcla resultante (*S-141*) se centrifuga (P-19/DC-104-*Centrifugation*) por lo que se generan dos corrientes (*waste-2* y *Phyco*). La primera de ellas es el sobrenadante final, que contiene proteínas y carbohidratos y, en la segunda de ellas se obtiene la PC con una pureza de 4,22 (corriente *Phyco*). De esta forma se consigue mejorar en casi 8 veces la pureza de la ficocianina, con respecto a su valor de partida (0,54).

El esquema de simulación de esta etapa se muestra también en la figura 103.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

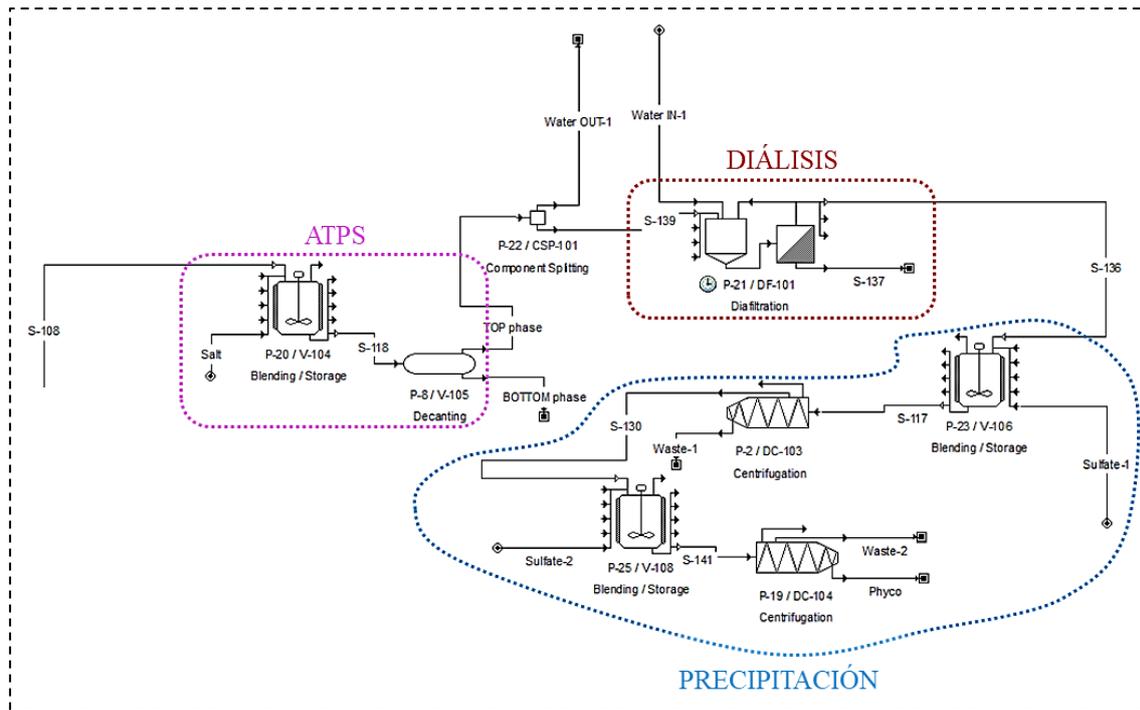


Figura 103. Diagrama de la separación y purificación de ficocianina mediante ATPS, diálisis y precipitación.

Observando la figura 103, se puede ver el esquema correspondiente a la etapa de separación de PC mediante ATPS (P-20/V-104-*Blending/Storage*), seguida de la decantación (P-8/V-105-*Decanting*) necesaria para separar ambas fases. Como se puede apreciar en la etapa de ATPS hay dos corrientes de entrada (*Salt* y *S-108*). La primera de ellas aporta la sal (K_2HPO_4) necesaria para el sistema ATPS y la segunda consiste en el extracto crudo de PC procedente de la etapa de extracción. Por otro lado, se tienen dos corrientes de salida: la primera, denominada *TOP phase*, que contiene la ficobiliproteína de interés con una recuperación de un 98,96% (pureza = 0,57) junto con el LI, va directamente al siguiente proceso de diálisis; y la segunda corriente, denominada *BOTTOM phase*, que está formada por carbohidratos, restos de proteínas y sales. En el presente trabajo esta última corriente se puede considerar como residuo [219]. Por último, dentro del proceso ATPS, la corriente intermedia (*S-118*) se obtiene después de mezclar el sistema ATPS con el extracto crudo de PC.

La etapa de recuperación del LI mediante diálisis (P-21/DF-101-*Diafiltration*), es necesaria para recuperar y reutilizar dicho LI en otras etapas de extracción de PC así como para purificar la PC. Como se puede apreciar hay dos corrientes de entrada (*TOP phase* y *water IN-1*): la primera de ellas proviene de la etapa de separación de PC mediante un sistema ATPS y la segunda contiene el agua necesaria para que se produzca la diálisis. Por otro lado, se tienen tres corrientes de salida (*S-137*, *S-136* y *water out-1*), la primera de ellas (*S-137*) es la corriente que contiene prácticamente la totalidad del LI (97%) acompañado de una gran cantidad de proteínas, agua y carbohidratos; la segunda (*S-136*), rica en PC parcialmente purificada, que va directamente

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

al siguiente proceso de purificación por precipitación y, por último, la corriente (*water out-1*) que contiene únicamente agua.

La última etapa de purificación de ficocianina consiste en dos precipitaciones consecutivas mezclando la corriente obtenida en la diálisis (*S-136*) con sulfato de amonio como agente precipitante (corrientes *sulfate-1* y *sulfate-2*) en dos mezcladores (*P-23/V-106-Blending/Storage* y *P-25/V-108-Blending/Storage*). Se obtiene una recuperación final de PC en el extracto purificado de más del 80%.

Los valores obtenidos a través de la simulación en las distintas etapas de ATPS, diálisis y precipitación se muestran a continuación en la tabla 39.

Tabla 39. Corrientes de entrada principales e intermedias, y corrientes de salida en la etapa separación y purificación de PC (ATPS, diálisis y precipitación).

Separación y purificación de ficocianina			
ATPS			
Entradas principales ATPS			
S-108		Salt	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	15,68		
Proteína*	731,67		
Ficocianina	131,19		
Aloficocianina	18,43		
Ficoeritrina	13,01		
[EMIM][EtSO ₄]	24807,98	K ₂ HPO ₄	20000
Lípidos	11,44		
Na ₂ HPO ₄	14,63		
NaH ₂ PO ₄	1,64		
NaNO ₃	0,97		
Agua	64806,67		
Corrientes intermedias			
S-118			
Compuesto	Caudal (g/h)		
Carbohidratos	15,68		
Proteína*	731,67		
Ficocianina	131,19		
Aloficocianina	18,43		
Ficoeritrina	13,01		
K ₂ HPO ₄	20000		
[EMIM][EtSO ₄]	24807,98		
Lípidos	11,44		
Na ₂ HPO ₄	14,63		
NaH ₂ PO ₄	1,64		
NaNO ₃	0,97		
Agua	64806,67		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Salidas ATPS					
TOP phase		BOTTOM phase			
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)		
Carbohidratos	9,62	Carbohidratos	6,06		
Proteína*	621,92	Proteína*	109,75		
Ficocianina	129,82	Ficocianina	1,36		
[EMIM][EtSO ₄]	24559,9	Aloficocianina	18,43		
Agua	32403,34	Ficoeritrina	13,01		
		K ₂ HPO ₄	20000		
		[EMIM][EtSO ₄]	248,08		
		Na ₂ HPO ₄	14,63		
		NaH ₂ PO ₄	1,64		
		NaNO ₃	0,97		
		Agua	32403,34		
Díálisis					
Entradas principales díálisis					
TOP phase		Water IN-1			
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)		
Carbohidratos	9,62				
Proteína*	621,92				
Ficocianina	129,82	Agua	26809,42		
[EMIM][EtSO ₄]	24559,9				
Agua	32403,34				
Corrientes intermedias					
S-139					
Compuesto		Caudal (g/h)			
Carbohidratos	9,62				
Proteína*	621,92				
Ficocianina	129,82				
[EMIM][EtSO ₄]	24559,9				
Agua	6480,67				
Energía					
Filtrador		1,55KWh			
Salidas díálisis					
S-136		S-137		Water OUT-1	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	3,97	Carbohidratos	5,65		
Proteína*	228,81	Proteína*	393,1		
Ficocianina	117,64	Ficocianina	12,18	Agua	25922,67
[EMIM][EtSO ₄]	662,45	[EMIM][EtSO ₄]	23897,45		
Agua	1411,99	Agua	31878,1		
1° Precipitación					
Entradas principales					
S-136			Sulfate-1		
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	3,97	Sulfato de amonio	265		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proteína*	228,81		
Ficocianina	117,64		
[EMIM][EtSO ₄]	662,45		
Agua	1411,99		
Corrientes intermedias			
S-117			
Compuesto	Caudal (g/h)		
Carbohidratos	3,97		
Proteína*	228,81		
Ficocianina	117,64		
[EMIM][EtSO ₄]	662,45		
Sulfato de amonio	265		
Agua	1411,99		
Energía			
Centrífuga P-2	1,84KWh		
Salidas			
S-130		Waste-1	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	3,35	Carbohidratos	0,62
Proteína*	189,18	Proteína*	39,63
Ficocianina	103,22	Ficocianina	14,42
Agua	1397,87	[EMIM][EtSO ₄]	662,45
		Sulfato de amonio	265
		Agua	14,12
2° Precipitación			
Entradas principales			
S-130		Sulfate-2	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	3,35		
Proteína*	189,18	Sulfato de amonio	325
Ficocianina	103,22		
Agua	1397,87		
Corrientes intermedias			
S-141			
Compuesto	Caudal (g/h)		
Carbohidratos	3,35		
Proteína*	189,18		
Ficocianina	103,22		
Sulfato de amonio	325		
Agua	1397,87		
Energía			
Centrífuga P-19	1,65KWh		
Salidas			
Phyco		Waste-2	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	1,20211	Carbohidratos	2,15

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

calor (P-12/HX-101-*Heat Exchanging*) el cual, gracias al vapor de agua (*steam*) generado en una caldera de gas natural (P-13/SG-101-*Steam Generation*), calienta dicha corriente hasta los 350°C en 30 minutos (S-105).

Para simular el proceso de HTL se utilizaron dos tanques. En el primero de ellos (P-16/V-102-*Blending/Storage*) se lleva a cabo la reacción y, tras un enfriamiento durante 5 minutos en un cambiador de calor (P-27/HX-102-*Cooling*), la corriente resultante (S-146) pasa al segundo tanque (P-26/V-107-*Blending/Storage*). En este, a la mezcla de reacción se le añade diclorometano, obteniéndose como productos de salida una fase gaseosa (CO_2) y otra corriente (S-145) que contiene el residuo sólido, la fase acuosa y el bioaceite que se separarán en la siguiente etapa. En este tanque también hay otra corriente de salida (*isopropanol-emitted*) mediante la cual se recupera prácticamente el 100% de isopropanol.

Para poder visualizar mejor el proceso de HTL se muestra la figura 105.

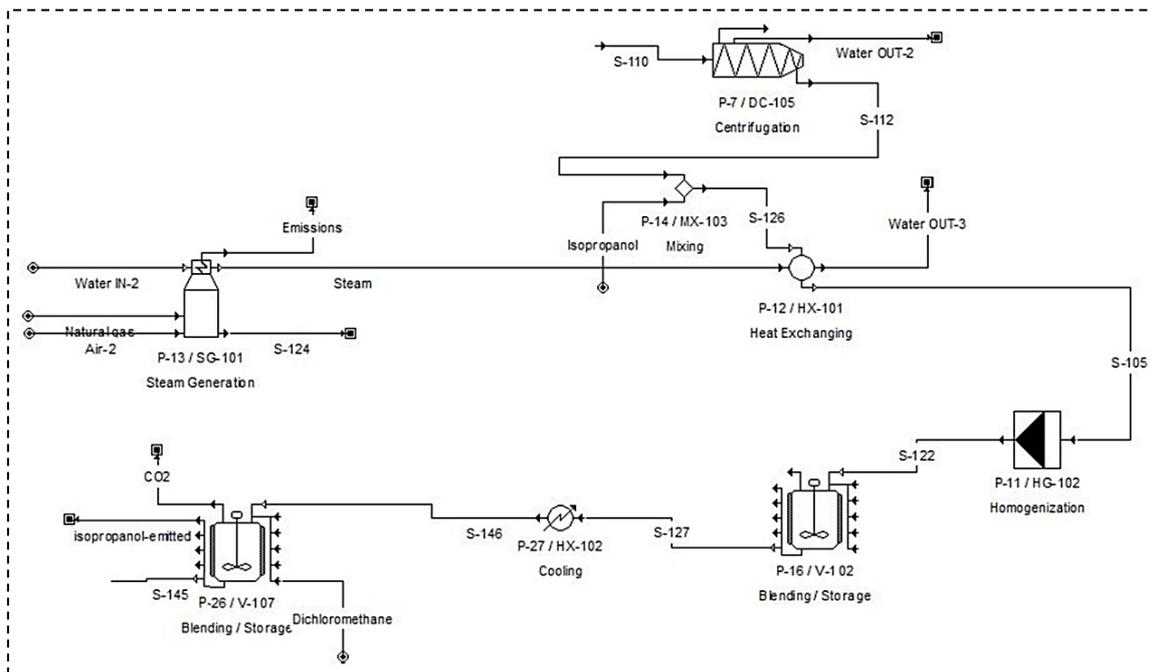


Figura 105. Diagrama de la etapa de reacción de HTL.

Los valores obtenidos a través de la simulación en las distintas etapas de la reacción de HTL se muestran a continuación en la tabla 40. Cabe destacar que, además de estar incluidas las corrientes de entrada y salida principales de la etapa de reacción de HTL, también se muestran las corrientes intermedias: S-122, *Steam*, S-126, S-105, S-122, S-127 y S-146.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 40. Corrientes de entrada principales e intermedias, y corrientes de salida en la etapa de reacción de licuefacción hidrotérmica.

Aprovechamiento de la biomasa residual					
Reacción de HTL					
Entradas principales					
S-110		Isopropanol		Water IN-2	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Biomasa residual	864,75				
Carbohidratos	66,54				
Proteína*	184,98				
Ficocianina	28,99				
Aloficocianina	17,87				
Ficoeritrina	9,2				
[EMIM][EtSO ₄]	0,02	Isopropanol	4323,71	Agua	6602,38
Lípidos	41,95				
Na ₂ HPO ₄	0				
NaH ₂ PO ₄	0				
NaNO ₃	0				
Agua	29293,33				
Natural gas		Air-2		Dicloromethane	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Metano	512,52	Air-2	9654,49	Diclorometano	55522,55
Corrientes intermedias					
S-112		Steam		S-126	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Biomasa residual	864,75			Biomasa residual	864,75
Carbohidratos	66,54			Carbohidratos	66,54
Proteína*	184,98			Proteína*	184,98
Ficocianina	28,99			Ficocianina	28,99
Aloficocianina	17,87			Ficoeritrina	9,2
Ficoeritrina	9,2			Aloficocianina	17,87
[EMIM][EtSO ₄]	0,02	Agua	6602,38	Isopropanol	4323,71
Lípidos	41,95			[EMIM][EtSO ₄]	0,02
Na ₂ HPO ₄	0			Lípidos	41,95
NaH ₂ PO ₄	0			Na ₂ HPO ₄	0
NaNO ₃	0			NaH ₂ PO ₄	0
Agua	4220,52			NaNO ₃	0
				Agua	4220,52
S-105		S-122		S-127	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Biomasa residual	864,75	Carbohidratos	66,54	Carbohidratos	66,54
Carbohidratos	66,54	Proteína*	184,98	Proteína*	184,98
Proteína*	184,98	Ficocianina	28,99	Ficocianina	28,99
Ficocianina	28,99	Aloficocianina	17,87	Aloficocianina	17,87
Aloficocianina	17,87	Ficoeritrina	9,2	Ficoeritrina	9,2
Ficoeritrina	9,2	Fase acuosa	264,18	Fase acuosa	264,18
Aloficocianina	17,87				

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Isopropanol	4323,71	Bioaceite	472,76	Bioaceite	472,76
[EMIM][EtSO ₄]	0,02	Sólidos HTL	2,59	Sólidos HTL	2,59
Lípidos	41,95	CO ₂	125,22	CO ₂	125,22
Na ₂ HPO ₄	0	Isopropanol	4323,71	Isopropanol	4323,71
NaH ₂ PO ₄	0	[EMIM][EtSO ₄]	0,02	[EMIM][EtSO ₄]	0,02
NaNO ₃	0	Lípidos	41,95	Lípidos	41,95
Agua	4220,52	Na ₂ HPO ₄	0	Na ₂ HPO ₄	0
		NaH ₂ PO ₄	0	NaH ₂ PO ₄	0
		NaNO ₃	0	NaNO ₃	0
		Agua	4220,52	Agua	4220,52

S-146

Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	66,54
Proteína*	184,98
Ficocianina	28,99
Aloficocianina	17,87
Ficoeritrina	9,2
Fase acuosa	264,18
Bioaceite	472,76
Sólidos HTL	2,59
CO ₂	125,22
Isopropanol	4323,71
[EMIM][EtSO ₄]	0,02
Lípidos	41,95
Na ₂ HPO ₄	0
NaH ₂ PO ₄	0
NaNO ₃	0
Agua	4220,52

Energía

Centrífuga P-7	5,08KWh
Caldera P-13	7,12 KWh
Intercambiador de calor P-12	5,64KWh
Enfriamiento P-27	5,61KWh

Salidas

Water OUT-2		Emissions		Water OUT-3	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
		CO ₂	1408,45		
		Nitrógeno	7406,13		
		Oxígeno	204,4		
		Agua	1148,38		
Agua	25072,81			Agua	6602,38

CO₂

Isopropanol emitted

S-145

Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
				Carbohidratos	66,54
				Proteína*	184,98
CO ₂	125,22	Isopropanol	4323,71	Ficocianina	28,99
				Aloficocianina	17,87
				Ficoeritrina	9,2

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase acuosa	264,18
Bioaceite	472,76
Sólidos HTL	2,59
Diclorometano	55522,55
[EMIM][EtSO ₄]	0,02
Lípidos	41,95
Na ₂ HPO ₄	0
NaH ₂ PO ₄	0
NaNO ₃	0
Agua	4220,52

*No incluidas ficobiliproteínas.

Con respecto a la tabla 40 cabe destacar que, aunque las corrientes intermedias *S-126* y *S-105* tengan la misma composición, cambia la temperatura a la que se encuentran, de forma que mientras que la corriente *S-126* entra a temperatura ambiente al intercambiador de calor, la corriente *S-105* sale del mismo a 350°C.

De igual forma, las corrientes *S-122*, *S-127* y *S-146* contienen los mismos compuestos variando únicamente la presión para el caso de las corrientes *S-122* y *S-127*, de forma que la primera está a presión de 1 bar mientras que la segunda tendrá la presión autógena generada a 350°C; y variando la temperatura para el caso de *S-127*, y *S-146*. La primera de ellas estará a 350°C y es la que entra al enfriador (*P-27/HX-102-Cooling*) mientras que la segunda (*S-146*) es la corriente de salida del enfriador que ya saldrá a 25°C.

La corriente de salida principal del proceso de HTL es la *S-145*, que contiene los productos principales: bioaceite, fase acuosa, y sólidos. Posteriormente, se procede a realizar la separación de los mismos. En primer lugar, la corriente resultante de la reacción (*S-145*) se introduce en una centrifuga (*P-24/DC-106-Centrifugation*) donde se separa y recupera la fase sólida generada (corriente *HTL solids*), produciendo la corriente *S-135* que está formada por el bioaceite y la fase acuosa (figura 106).

Para separar la fase acuosa del bioaceite, la corriente *S-135* se introduce en un decantador (*P-15/V-103-Decanting*) obteniendo de esta forma, la fase acuosa (*S-128*), más ligera, y el bioaceite disuelto en diclorometano (*S-125*). Para reducir el contenido de humedad de la fase acuosa, ésta se introduce en un secadero rotativo (*P-18/RDR-101-Rotary Drying*). Por otro lado, la corriente que contiene el bioaceite (*S-125*) se introduce en una columna de destilación (*P-17/C-101-Distillation*) donde se separa el disolvente (diclorometano) por cabeza de columna (corriente *dicloromethane-rec*) y el bioaceite se obtiene por fondo (corriente *Biocrude*), con un rendimiento aproximado del 55%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

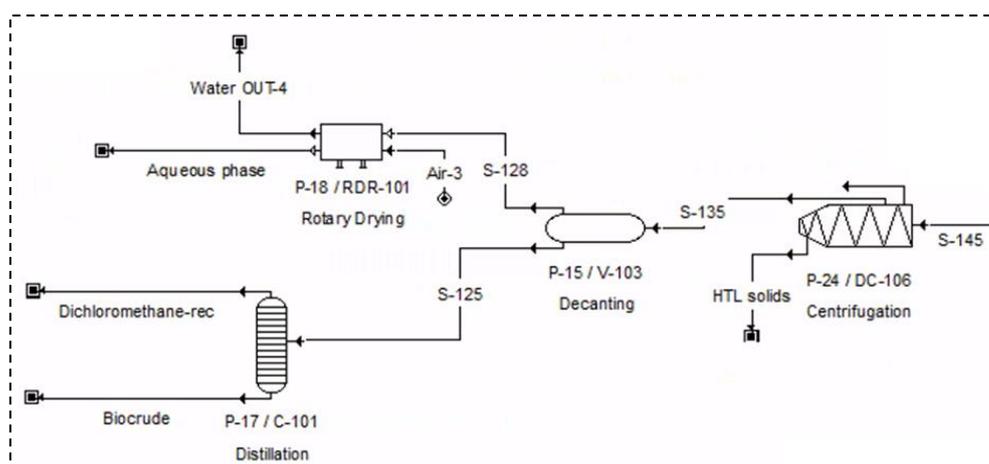


Figura 106. Diagrama de la etapa de recuperación de productos.

En la tabla 41 se muestran los resultados de simulación obtenidos para la etapa de separación y recuperación de productos de HTL (referidos a la unidad funcional).

Tabla 41. Corrientes de entrada principales e intermedias, y corrientes de salida en la etapa de recuperación de productos de licuefacción hidrotérmica.

Aprovechamiento de la biomasa residual					
Recuperación de productos HTL					
Entradas principales					
S-145			Air-3		
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	66,54				
Proteína*	184,98				
Ficocianina	28,99				
Aloficocianina	17,87				
Ficoeritrina	9,2				
Fase acuosa	264,18				
Bioaceite	472,76				
Sólidos HTL	2,59	Aire	21089,07		
Diclorometano	55522,55				
[EMIM][EtSO ₄]	0,02				
Lípidos	41,95				
Na ₂ HPO ₄	0				
NaH ₂ PO ₄	0				
NaNO ₃	0				
Agua	4220,52				
Corrientes intermedias					
S-135		S-128		S-125	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	66,54	Carbohidratos	66,54		
Proteína*	184,98	Proteína*	184,98	Bioaceite	472,76

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ficocianina	28,99	Ficocianina	28,99		
Aloficocianina	17,87	Aloficocianina	17,87		
Ficoeritrina	9,2	Ficoeritrina	9,2		
Fase acuosa	264,18	Fase acuosa	264,18		
Bioaceite	472,76	Diclorometano	27,76	Diclorometano	55494,73
Diclorometano	55522,49	[EMIM][EtSO ₄]	0,02		
[EMIM][EtSO ₄]	0,02	Na ₂ HPO ₄	0		
Lípidos	41,95	NaH ₂ PO ₄	0		
Na ₂ HPO ₄	0	NaNO ₃	0		
NaH ₂ PO ₄	0	Agua	4218,41	Lípidos	41,95
NaNO ₃	0				
Agua	4218,41				
Energía					
Centrífuga P-24				6,06KWh	
Destilador P-17- Hervidor				7,01KWh	
Destilador P-17- Condensador				6,40KWh	
Salidas					
HTL Solids		Water OUT-4		Aqueous phase	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Carbohidratos	0			Carbohidratos	66,54
Proteína*	0			Proteína*	184,98
Ficocianina	0	Nitrógeno	16177,8	Ficocianina	28,99
Aloficocianina	0			Aloficocianina	17,87
Ficoeritrina	0			Ficoeritrina	9,2
Fase acuosa	0			Fase acuosa	264,18
Bioaceite	0	Oxígeno	4911,27	Diclorometano	27,76
Sólidos HTL	2,59			[EMIM][EtSO ₄]	0,02
Diclorometano	0,06			Na ₂ HPO ₄	0
Lípidos	0			NaH ₂ PO ₄	0
Agua	2,11	Agua	4217,81	NaNO ₃	0
				Agua	0,6
Dicloromethane-rec			Biocrude		
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Bioaceite	0,05	Bioaceite	472,71		
Diclorometano	54939,79	Diclorometano	554,95		
		Lípidos	41,95		

*No incluidas ficobiliproteínas.

2. Biorrefinería 2: Extracción y purificación de PC + digestión anaerobia

La otra vía de aprovechamiento de la biomasa residual en la presente tesis doctoral fue mediante digestión anaerobia para generar biogás (figura 107). De igual manera que se hizo para el proceso de HTL, la corriente de la biomasa residual (*S-110*) generada tras la extracción de ficocianina se somete a una centrifugación (*P-7/DC-105-Centrifugation*) para retirar parcialmente el agua que contiene y obtener el grado de humedad adecuado para el proceso. La biomasa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

residual ya centrifugada (corriente *S-112*) se mezcla con la corriente de glicerol (*Glycerol*) y que los resultados experimentales demuestran que su uso como cosustrato mejora la producción de metano. Dicha mezcla se lleva a cabo en un mezclador (*P-14/MX-103-Mixing*) cuya corriente de salida (*S-104*) entra a un calentador (*P-11/HX-101-Heating*) donde eleva su temperatura hasta los 37°C (*S-105*) ya que la digestión anaerobia se va a llevar a cabo en condiciones mesofílicas y con un tiempo de residencia aproximado de 30 días. Del digestor (*P-12/AD-101-Anaerobic digestion*) se obtienen las dos corrientes de salida una de ellas contiene el biogás producido (*Biogas*) y la otra el residuo o digestato (*digestate*). En este proceso se tienen las corrientes de entrada: *S-110* y *Glycerol* y las corrientes de salida *water OUT - 2*, *biogas* y *digestate*.

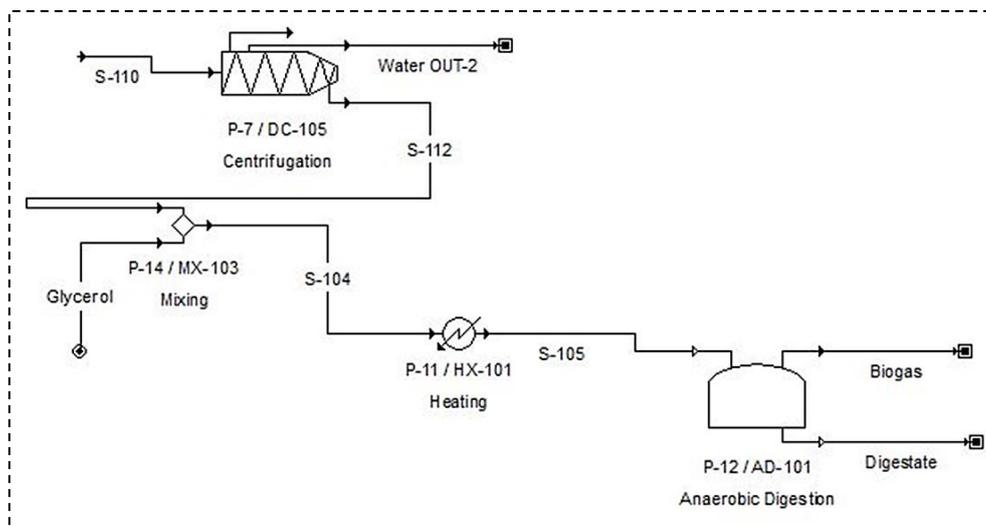


Figura 107. Diagrama de aprovechamiento de la biomasa residual mediante digestión anaerobia (Biorrefinería 2).

A continuación, se muestra la tabla 42 con los resultados obtenidos tras la simulación para esta vía de aprovechamiento de la biomasa residual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 42. Corrientes de entrada principales e intermedias, y corrientes de salida en la etapa de digestión anaerobia.

Aprovechamiento de la biomasa residual					
Digestión anaerobia					
Entradas principales					
S-110			Glycerol		
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Biomasa residual	864,75				
Carbohidratos	66,54				
Proteína*	184,98				
Ficocianina	28,99	Glicerol	146,85		
Aloficocianina	17,87				
Ficoeritrina	9,2				
[EMIM][EtSO ₄]	0,02				
Lípidos	41,95				
Na ₂ HPO ₄	0	Agua	7,63		
NaH ₂ PO ₄	0				
NaNO ₃	0				
Agua	29293,33				
Corrientes intermedias					
S-112		S-104		S-105	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
Biomasa residual	864,75	Biomasa residual	864,75	Biomasa residual	864,75
Carbohidratos	66,54	Carbohidratos	66,54	Carbohidratos	66,54
Proteína*	184,98	Proteína*	184,98	Proteína*	184,98
Ficocianina	28,99	Ficocianina	28,99	Ficocianina	28,99
Aloficocianina	17,87	Aloficocianina	17,87	Aloficocianina	17,87
Ficoeritrina	9,2	Ficoeritrina	9,2	Ficoeritrina	9,2
[EMIM][EtSO ₄]	0,02	Glicerol	146,85	Glicerol	146,85
Lípidos	41,95	[EMIM][EtSO ₄]	0,02	[EMIM][EtSO ₄]	0,02
Na ₂ HPO ₄	0	Lípidos	41,95	Lípidos	41,95
NaH ₂ PO ₄	0	Na ₂ HPO ₄	0	Na ₂ HPO ₄	0
NaNO ₃	0	NaH ₂ PO ₄	0	NaH ₂ PO ₄	0
Agua	2135,48	NaNO ₃	0	NaNO ₃	0
		Agua	2143,11	Agua	2143,11
Salidas					
Water OUT-2		Biogas		Digestate	
Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)	Compuesto	Caudal (g/h)
		CO ₂	737,54893	Carbohidratos	66,54
		Metano	376,40301	Proteína*	184,98
				Ficocianina	28,99
				Aloficocianina	17,87
				Ficoeritrina	9,2
				Amonio	114,16
				Glicerol	146,85
				[EMIM][EtSO ₄]	0,02
Agua	27157,85				

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lípidos	41,95
Na ₂ HPO ₄	0
NaH ₂ PO ₄	0
NaNO ₃	0
Agua	1780,82

*No incluidas ficobiliproteínas.

Al igual que en procesos anteriores para el inventario también se tuvieron en cuenta las corrientes intermedias del proceso: *S-112*, *S-104* y *S-105*.

Una vez obtenidas las tablas de los inventarios de ciclo de vida, se procede a la evaluación de impactos de ciclo de vida (EICV) que se detalla a continuación en el *apartado 4.7.3*.

4.7.3. Evaluación de impactos

Una vez elaborado y analizado el inventario obtenido mediante simulación se procede a evaluar tanto cualitativa como cuantitativamente los impactos ambientales asociados al proceso, empleando el programa SimaPro 7.2. Para ello, en primer lugar, deben determinarse qué categorías de impacto van a ser consideradas.

Entre los métodos de evaluación de impactos se han seleccionado dos metodologías [471]:

- CML 2001
- Demanda de energía acumulada (CED)

La metodología de CML elaborada por el Instituto de Ciencias medioambientales de la Universidad de Leiden en los Países Bajos es la metodología más utilizada y suele considerarse más completa. Cabe destacar que el método “*CML 2001*” contiene más de 1700 flujos diferentes que se pueden descargar desde su página web (<http://www.cml.leiden.edu/software/data-cmlia.html>). Dicho método se puede dividir en línea de base y no línea de base, siendo la primera la que contiene las categorías de impacto más comunes utilizadas en ACV [471,472].

Dentro de la metodología CML 2001 se han elegido las siguientes categorías de impacto:

- Agotamiento de recursos abióticos (AD): se puede definir como la disminución de la disponibilidad de recursos materiales (tanto renovables como no renovables) debido a un uso masivo de ellos. De forma general, esta categoría se refiere al consumo de recursos no biológicos como combustibles fósiles, minerales, metales, agua, etc. Está formado por la cantidad de recursos que se agotan y se mide en equivalentes de antimonio en algunos modelos [471].
- Acidificación (A): los gases ácidos como el dióxido de azufre (SO₂) reaccionan con el agua de la atmósfera formando la denominada “lluvia ácida”. Cuando esta lluvia cae, a menudo a una distancia considerable de la fuente original del gas, provoca un deterioro del

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ecosistema. Los gases que provocan la deposición ácida incluyen amoníaco (NH_3), óxidos de nitrógeno (NO_x) y óxidos de azufre (SO_x) [473].

- Eutrofización (E): es la acumulación de nutrientes químicos en un ecosistema que conduce a una productividad anormalmente elevada. Esto provoca un crecimiento excesivo de plantas, como algas en los ríos y mares, lo que provoca reducciones severas en la calidad del agua y en las poblaciones de animales. Las emisiones de amoníaco, nitratos, óxidos de nitrógeno y fósforo a la atmósfera o al agua tienen impacto en la eutrofización. Esta categoría se expresa utilizando como unidad de referencia kg PO_4^{3-} equivalentes.

- Cambio climático (GW): se puede definir como el cambio en la temperatura global terrestre causado por el efecto invernadero generado por la liberación de “gases de efecto invernadero” por parte de la actividad humana. Hoy en día existe consenso científico en considerar que el aumento de estas emisiones está teniendo un gran efecto en el clima. Se espera que dicho aumento de la temperatura global provoque perturbaciones climáticas, desertificación, aumento del nivel del mar y propagación de enfermedades. El modelo de caracterización de Perfiles Ambientales se basa en factores desarrollados por el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) de la ONU. Dichos factores se expresan como Potencial de Calentamiento Global en diferentes horizontes temporales, siendo el más común 100 años (GWP100), medido en la unidad de referencia kg CO_2 equivalentes [471].

- Toxicidad humana (HT): el potencial de toxicidad humana es un índice calculado que refleja el daño potencial de una unidad de sustancia química liberada en el medio ambiente y se basa tanto en la toxicidad inherente de un compuesto como en su dosis potencial. Estos subproductos (principalmente arsénico, dicromato de sodio y fluoruro de hidrógeno) proceden, en su mayor parte, de la producción de electricidad a partir de fuentes fósiles. Dichos subproductos son potencialmente peligrosos para los humanos por inhalación, ingestión e incluso contacto; llegando a producir cáncer, problemas respiratorios, etc. Esta categoría de impacto se mide en kg equivalentes de 1,4-diclorobenceno (1,4 DB).

- Ecotoxicidad terrestre (TE): La toxicidad ambiental se mide en tres categorías de impacto separadas que examinan el agua dulce, el agua marina y el terreno. La evaluación de la toxicidad se ha basado en las concentraciones máximas tolerables en el agua para los ecosistemas. Los factores de caracterización se expresan utilizando la unidad de referencia kg 1,4 de diclorobenceno equivalente (1,4 DB).

Por otro lado, el método de Demanda de Energía Acumulada (CED) se creó en base al método publicado por el centro Ecoinvent [474]. Este método tiene como objetivo investigar el uso de la energía a lo largo del ciclo de vida de un proceso. Esto incluye tanto los usos directos como los indirectos. Este método se desarrolló a principios de los setenta después de la primera crisis del petróleo y cuantifica la cantidad de energía primaria consumida a lo largo del ciclo de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

vida de un proceso, tanto de origen fósil como renovable.

Una vez que se han planteado todas las categorías de impacto que se van a estudiar y las tablas de inventario, se procede a realizar la cuantificación de los impactos ambientales seleccionados empleando el software SimaPro 7.2, tanto para la etapa de cultivo, extracción y purificación de ficocianina como para el aprovechamiento de la biomasa residual.

4.7.3.1. Cultivo, extracción y purificación de ficocianina

En este apartado se van a representar los impactos ambientales del proceso de extracción y purificación de ficocianina, por lo que se incluyen asimismo tanto la etapa de cultivo de la microalga de partida (*Arthrospira platensis*), como la etapa de secado de dicha microalga (tablas 43 y 44).

Tabla 43. Datos correspondientes al proceso de cultivo de la microalga *Arthrospira platensis* y al proceso de extracción y purificación de PC.

Categoría de impacto	Unidad	Cultivo	Secado	Extracción de PC	ATPS
Agotamiento de recursos abióticos	kg Sb eq	0,038	0,433	0,042	0,012
Acidificación	kg SO ₂ eq	0,107	0,567	0,046	0,043
Eutrofización	kg PO ₄ ³⁻ eq	0,047	0,029	0,003	0,020
Calentamiento global 100 años	kg CO ₂ eq	10,613	59,098	5,299	2,866
Toxicidad humana 100 años	kg 1,4-DB eq	3,611	9,198	0,695	1,244
Ecotoxicidad terrestre 100 años	kg 1,4-DB eq	0,011	0,011	0,001	0,004
Demanda de Energía Acumulada	MJ eq	86,521	1207,311	112,962	27,959

Tabla 44. Datos correspondientes al proceso de cultivo de la microalga *Arthrospira platensis* y al proceso de extracción y purificación de PC (continuación).

Categoría de impacto	Unidad	Díálisis	Precipitación	Total
Agotamiento de recursos abióticos	kg Sb eq	0,006	0,013	0,544
Acidificación	kg SO ₂ eq	0,008	0,017	0,788
Eutrofización	kg PO ₄ ³⁻ eq	0,000	0,001	0,101
Calentamiento global 100 años	kg CO ₂ eq	0,786	1,775	80,436
Toxicidad humana 100 años	kg 1,4-DB eq	0,122	0,279	15,149
Ecotoxicidad terrestre 100 años	kg 1,4-DB eq	0,000	0,000	0,028
Demanda de Energía Acumulada	MJ eq	16,053	36,233	1487,039

A partir de los datos de las tablas anteriores se calculan las contribuciones relativas de cada etapa en cada una de las categorías de impacto estudiadas. Para poder verlo de forma más visual se presenta la figura 108.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

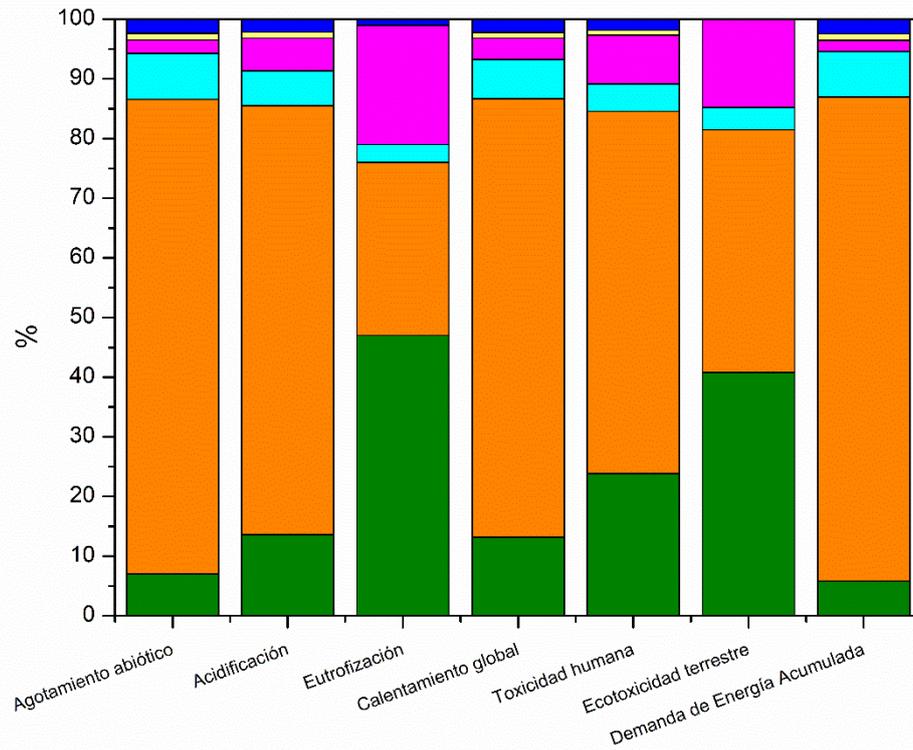


Figura 108. Contribuciones relativas de cada etapa en cada una de las categorías de impacto estudiadas. Etapas de: cultivo (■), secado (■), extracción de PC (■), ATPS (■), diálisis (■) y precipitación (■).

Como se puede observar en la figura 108 la etapa de secado es la que más influye en casi todas las categorías de impacto, teniendo contribuciones desde un 40%, para el caso de la ecotoxicidad terrestre, hasta un 80% para el caso de la Demanda de Energía Acumulada (CED) y en el agotamiento de recursos abióticos. Para el caso de la presente tesis doctoral, como ya se ha mencionado, la microalga con la que se trabaja experimentalmente está liofilizada, con lo que se requiere de un secado previo de la biomasa y su posterior liofilización, lo que genera un gran impacto de esta etapa en las diferentes categorías de impacto. Esta gran influencia de la etapa de secado se debe, fundamentalmente, al componente fósil que forma parte del mix eléctrico español utilizado como base de datos en el programa SimaPro 7.2.

En primer lugar, se analizará de forma más detallada la etapa de secado en cada categoría, ya que es la que más impacto genera. En el agotamiento abiótico tiene una contribución de casi el 80%. Esto es debido a que se incluyen las reservas de los combustibles y la mayor parte de electricidad que se consume en la etapa de secado, según el mix eléctrico español, se basa en el uso de combustibles fósiles (carbón, petróleo, gas natural.). Con respecto a la acidificación, el secado contribuye aproximadamente el 70% y es debido a la quema de los combustibles fósiles. Esto se debe a que el azufre y el nitrógeno, presente en el aire y también en dichos combustibles son liberados a la atmósfera tras procesos de combustión en forma de óxidos de nitrógeno (NO_x) y dióxido de azufre (SO_2) que son los principales responsables de la deposición ácida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, la contribución de la etapa de secado al cambio climático es cercana al 75%, esto es debido a que la energía necesaria para la etapa de secado procede de recursos no renovables generando de esta manera grandes cantidades de CO₂ que acentúan el efecto invernadero. En relación con las ecotoxicidades, tanto en la humana como en la terrestre, la etapa de secado también presenta considerables contribuciones en ambas, siendo de un 60 y de un 40%, respectivamente. Este efecto alto de la etapa de secado en ambas se debe, principalmente, a las emisiones tóxicas que se encuentran asociadas a compuestos nocivos generados durante el proceso de obtención de electricidad proveniente también de los combustibles fósiles.

En cuanto a la demanda de energía acumulada, de igual forma, la etapa de secado presenta una alta contribución, en torno al 81% y, se debe al gran uso de la energía eléctrica que esta etapa requiere. Este alto porcentaje se debe a que la CED es una metodología que cuantifica la energía primaria que se consume en el proceso, por ese motivo al ser la etapa de secado la que más energía consume, se obtiene el mayor porcentaje.

Como ya se ha mencionado la etapa de secado genera un gran impacto ambiental en casi todas las categorías de impacto estudiadas, excepto en la eutrofización. En esta categoría se puede comprobar que la etapa de secado tiene una contribución del 29%. Esto es debido a que en la etapa de cultivo se emplean numerosos fertilizantes y la producción de éstos implica cierta energía y recursos, aunque la energía que se necesita es menor, de ahí que el porcentaje sea relativamente pequeño. Por el contrario, la etapa de cultivo genera un gran impacto en la eutrofización de casi un 50%. Ya que la utilización de los fertilizantes, necesarios para el crecimiento, puede resultar en la acumulación de éstos y el consiguiente crecimiento excesivo de algas en los ríos, lo que provoca reducciones acusadas en la calidad de agua. La mayor contribución de impacto que se puede encontrar en esta etapa se debe al uso del ácido fosfórico para la obtención de estos fertilizantes.

Dentro de la categoría de eutrofización, la siguiente etapa que más impacto genera es el sistema de dos fases acuosas (ATPS) y se debe principalmente al uso de la sal (K₂HPO₄).

La etapa de extracción de ficocianina no resulta muy contaminante para ninguna categoría, contribuyendo entre un 3-8%. Esta pequeña contribución se debe al uso del líquido iónico [(EMIM)[EtSO₄]] para realizar la extracción de PC. Las mayores contribuciones se dan en el agotamiento de recursos abióticos (8%) y en la demanda de energía acumulada (8%). Con respecto a la primera, en la extracción se utiliza líquido iónico junto con ultrasonidos, que requiere el uso de energía eléctrica, la cual incluye las reservas de los combustibles y, según el mix eléctrico español influye negativamente y con respecto a la segunda, el CED cuantifica la energía primaria que se consume en el proceso, la contribución en esta categoría de impacto no es muy elevada porque el equipo de ultrasonidos no se utiliza un tiempo prolongado. Con respecto al uso

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

del líquido iónico, las demás categorías (toxicidad humana y ecotoxicidad terrestre) no tienen contribuciones elevadas puesto que los líquidos iónicos tienen una casi nula presión de vapor con lo que se reducen las vías de exposición.

Con respecto a la etapa de purificación de PC y, concretamente, en la etapa del sistema bifásico acuoso, como ya se ha mencionado tiene un gran efecto en la eutrofización y, de igual forma, en la ecotoxicidad terrestre ya que parte de esas sales (K_2HPO_4) que están presentes en la fase inferior del sistema ATPS, considerada como “residuo” pueden ser emitidas al aire, al suelo, a las aguas superficiales y subterráneas y tener una alta contribución en la ecotoxicidad terrestre.

Por último, cabe destacar que las dos etapas que menos impacto generan en todas las categorías de impacto son la diálisis y la precipitación, con contribuciones del 1-3%. Esta baja contribución para ambas etapas y en todas las categorías se debe principalmente a que son dos etapas que requieren pocos recursos, tanto materiales como energéticos. Para el caso de los recursos energéticos que necesitan, es decir, la electricidad, la necesitan en tan poca proporción que el impacto que genera en comparación con el resto de las etapas del proceso de purificación de ficocianina es mucho menor.

4.7.3.2. Aprovechamiento de la biomasa residual. HTL frente a Biogás

Los dos procesos alternativos seleccionados para el aprovechamiento energético de la biomasa residual obtenida en la etapa de extracción de PC han sido la licuefacción hidrotérmica para obtener bioaceite (biorrefinería 1) o la digestión anaerobia para obtener biogás (biorrefinería 2). En este apartado se realizará un estudio comparativo de ambas con el fin de conocer los correspondientes impactos en cada una de las categorías analizadas.

Los resultados obtenidos para cada uno de los dos procesos, por unidad de energía producida, se muestran en la tabla 45. Para determinar la energía contenida (expresada en MJ) en el bioaceite y el biogás, se multiplica la masa producida de cada uno de ellos por su correspondiente poder calorífico. Por lo que para el bioaceite se obtienen 18,6 MJ y para el biogás 20,78 MJ, teniendo en cuenta que el poder calorífico superior del bioaceite es de 39,67 MJ/kg y el del biogás es 18,65 MJ/kg.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 45. Datos correspondientes al proceso de aprovechamiento de la biomasa residual.

Categoría de impacto	Unidad	Bioaceite	Biogás
Agotamiento de recursos abióticos	kg Sb eq	1,412	0,376
Acidificación	kg SO ₂ eq	0,670	0,202
Eutrofización	kg PO ₄ ³⁻ eq	1,049	0,168
Calentamiento global 100 años	kg CO ₂ eq	1,064	0,298
Toxicidad humana 100 años	kg 1,4-DB eq	1,693	0,174
Ecotoxicidad terrestre 100 años	kg 1,4-DB eq	0,681	0,204
Demanda de Energía Acumulada	MJ eq	1,280	0,364

La figura 109 muestra la comparación normalizada de los procesos estudiados, a partir de los datos de la tabla 45.

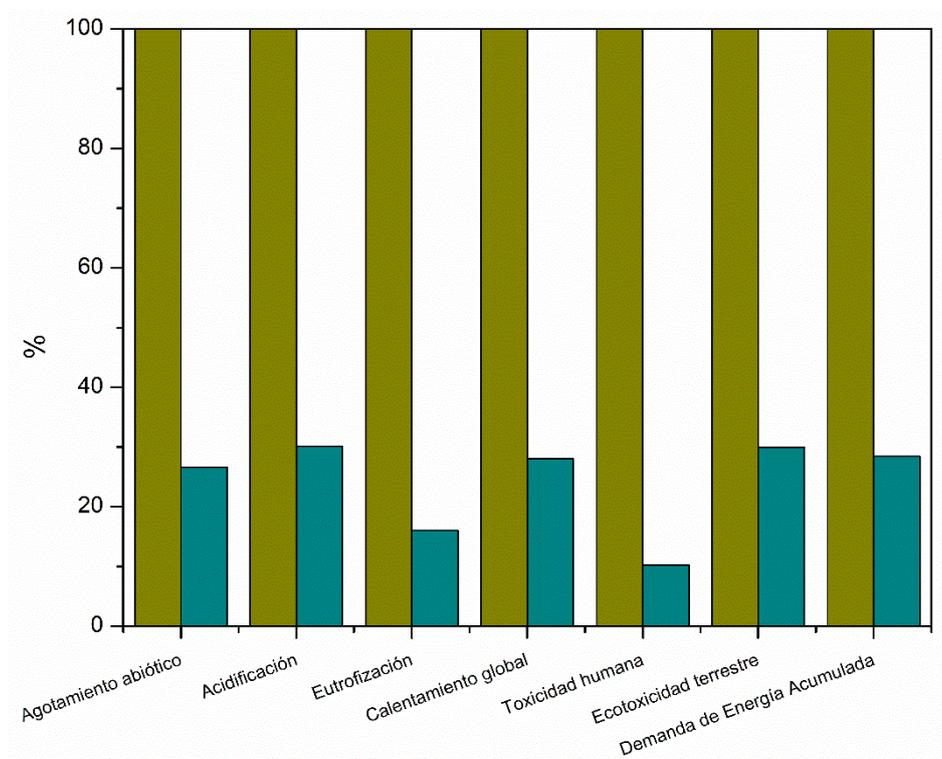


Figura 109. Comparativa del bioaceite (■) y del biogás (■) en cada una de las categorías de impacto estudiadas.

Como se puede apreciar en la figura 109 la producción de bioaceite mediante licuefacción hidrotérmica genera un mayor impacto que la obtención de biogás mediante digestión anaerobia (10-30%) en todas las categorías de impacto analizadas. Esto es debido fundamentalmente a las condiciones de temperatura y presión, mucho más extremas, que requiere el proceso de HTL comparado con la digestión anaerobia.

En primer lugar, se analizará de forma más detallada la etapa de HTL en algunas de las categorías de impactos como la toxicidad humana, en la eutrofización y en el agotamiento

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

abiótico. En el caso de la toxicidad humana, este gran efecto se debe a las emisiones tóxicas que se encuentran asociadas a compuestos nocivos utilizados o generados durante el proceso, como pueden ser los alcoholes empleados como cosolvente, los gases generados o el disolvente usado para aislar los productos de reacción (diclorometano). Por otro lado, el proceso de HTL requiere electricidad que, según el mix eléctrico español, se produce a partir de combustibles fósiles, lo que origina ciertos subproductos como el arsénico, dicromato de sodio y fluoruro de hidrógeno.

Con respecto a la eutrofización, la etapa de HTL tiene un gran impacto ya que una de las fracciones que se obtiene, la fracción acuosa, es rica en Mg, K, Fe, Ca, N, P y otros minerales. Esta fracción puede recircularse y utilizarse en la etapa de cultivo de microalgas y puede provocar la acumulación de nutrientes químicos en el ecosistema. Esto provoca un crecimiento excesivo de plantas como algas en los ríos, lo que provoca reducciones severas en la calidad del agua y en las poblaciones de animales. Por ello, las emisiones de amoníaco, nitratos, óxidos de nitrógeno y fósforo al aire o al agua tienen impacto en la eutrofización.

El agotamiento abiótico tiene una alta contribución ya que se incluyen las reservas de los combustibles, y la naturaleza del mix eléctrico español influye negativamente como se ha comentado anteriormente.

En segundo lugar, para poder determinar las causas de los impactos tan elevados del proceso de HTL en comparación con los de DA, se han analizado con más detalle las dos subetapas que el proceso de HTL conlleva: la de reacción y la de separación. La tabla 46 muestra los resultados de ambas.

Tabla 46. Datos correspondientes a las dos subetapas de HTL.

Categoría de impacto	Unidad	Fase de reacción	Fase de separación	Total
Agotamiento de recursos abióticos	kg Sb eq	1,152	0,259	1,412
Acidificación	kg SO ₂ eq	0,416	0,254	0,670
Eutrofización	kg PO ₄ ³⁻ eq	0,933	0,116	1,049
Calentamiento global 100a	kg CO ₂ eq	0,774	0,290	1,064
Toxicidad humana 100a	kg 1,4-DB eq	1,560	0,134	1,693
Ecotoxicidad terrestre 100a	kg 1,4-DB eq	0,432	0,249	0,681
Demanda de Energía Acumulada	MJ eq	1,021	0,259	1,280

De igual forma que se ha hecho con anterioridad se han calculado las contribuciones relativas de cada subetapa en cada una de las categorías de impacto estudiadas, para poder verlo de forma más visual se presenta la figura 110.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

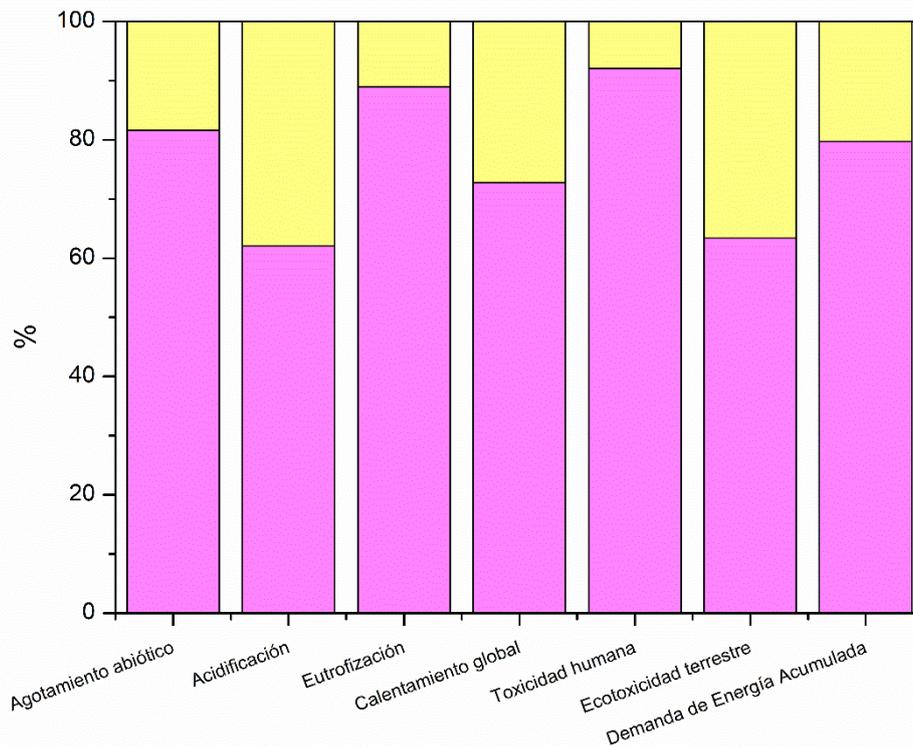


Figura 110. Contribuciones relativas de las subetapas del proceso de HTL en cada una de las categorías de impacto estudiadas (Reacción (■) y Separación (■)).

Como se observa en la figura 110 la etapa de reacción es la que tiene un mayor impacto, entre el 60-90%, con respecto a la de separación (8-38%). Esto se debe, principalmente, al uso de energía para que se lleve a cabo la reacción de licuefacción hidrotérmica a temperaturas elevadas de 350°C, siendo reflejado en la categoría de impacto de agotamiento abiótico y CED; ya que para alcanzar esas temperaturas se requiere el uso de electricidad que proviene de recursos no renovables. El proceso de HTL, como ya se ha mencionado, requiere electricidad que se produce a partir de combustibles fósiles, que en su combustión generan ciertos subproductos como el arsénico, dicromato de sodio y fluoruro de hidrógeno. Dichos subproductos son potencialmente peligrosos para la salud humana, llegando a producir cáncer; por eso la etapa de reacción tenga una elevada contribución a la toxicidad humana (92%).

De igual forma, la generación de la fase gaseosa que contiene un alto contenido de CO₂, uno de los gases de efecto invernadero que causan el cambio climático y que, trabajando a temperaturas entre 175°C-350°C es el producto principal en la fase gaseosa, se refleja en una alta contribución al calentamiento global (72%).

Por el contrario, la fase de separación de productos presenta una mayor contribución en las categorías de impacto de acidificación y ecotoxicidad terrestre. Con respecto a la acidificación, los equipos de separación utilizados demandan electricidad que, según el mix eléctrico español, proviene de la quema de los combustibles fósiles, como el carbón. Tanto el azufre como el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

nitrógeno, que se encuentran en los combustibles, son liberados a la atmósfera en los procesos de combustión en forma de óxidos de nitrógeno (NO_x) y dióxido de azufre (SO_2) que son los principales responsables de la deposición ácida. En relación con la ecotoxicidad terrestre, tanto la eliminación del isopropanol como la del diclorometano del bioaceite deseado causan un impacto muy elevado inmediato o a largo plazo en el medio ambiente al ser emitidos al terreno.

A modo de resumen, cabe destacar que en las etapas previas de cultivo, extracción y purificación de ficocianina (etapas comunes en ambas biorrefinerías), la etapa de secado es la que tiene un mayor impacto en casi todas las categorías estudiadas (40-80%), seguida de la etapa de cultivo, que genera un gran impacto en la categoría de eutrofización (~50%). Sin embargo, es importante destacar que las siguientes etapas de purificación como son el sistema ATPS, la diálisis y la precipitación, no generan impactos tan elevados, manteniéndose con contribuciones en el intervalo 15-25%.

Con respecto al estudio de los impactos ambientales asociados a cada biorrefinería, cabe destacar que la biorrefinería 1 (HTL) es la que genera un mayor impacto ambiental en todas las categorías de impacto analizadas. Como ya se ha mencionado, esto es debido a las condiciones más severas en las que se desarrolla el proceso de HTL, tanto de temperatura como de presión. Igualmente, se ha analizado en detalle el proceso de HTL y sus subetapas con el fin de esclarecer cuál de ellas es la que genera un mayor impacto. Se ha concluido que la etapa limitante en el proceso de HTL y la que genera, por tanto, mayores impactos ambientales es la etapa de reacción (con contribuciones del 60-90%).

Por todo lo mencionado anteriormente, el esquema de biorrefinería 2 (DA) es el que resulta medioambientalmente más viable.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Como resultado de la presente tesis doctoral basada en la combinación del proceso de extracción, separación y purificación de ficocianina, junto con el aprovechamiento energético de la biomasa residual obtenida; ambos incluidos en un esquema de biorrefinería, se han extraído las siguientes conclusiones:

Extracción y purificación de ficocianina

1. Las condiciones óptimas para maximizar la cantidad de ficocianina extraída fueron: Suspensión de *Arthrospira platensis* 1,8% p/v en una disolución de líquido iónico [EMIM][EtSO₄] al 20,86% p/p, junto con pretratamiento mediante ultrasonidos a una potencia del 80% y durante 25 minutos. El experimento de extracción en condiciones óptimas se llevó a cabo por triplicado y se obtuvo un valor experimental de $76,6 \pm 0,4$ mg/g (E_{PC}), que coincidió con el valor predicho por el modelo matemático obtenido del diseño factorial de experimentos 75,9 mg/g (E_{PC}).
2. El uso del LI [EMIM][EtSO₄] junto con el pretratamiento con ultrasonidos extrae más cantidad de ficocianina que los LIs [BMIM][MeSO₄] y [BMIM][Cl] considerados grandes disruptores y que los LIs 2-HEAA, 2-HEAF y su mezcla 2-HEAA+2-HEAF publicados previamente en bibliografía.
3. El [EMIM][EtSO₄] se reutilizó con éxito durante 7 ciclos de extracción de ficocianina, lo que resultó clave en el proceso ya que el alto coste que supone utilizar un LI aprótico como el [EMIM][EtSO₄] fue minimizado por dichas reutilizaciones. La capacidad de extracción de dicho LI se redujo solamente en un 21% menos de ficocianina que con LI puro tras el 7º ciclo de extracción.
4. El [EMIM][EtSO₄] fue el LI que formaba parte del sistema ATPS con el que se ha conseguido una mayor recuperación y pureza de ficocianina y, por tanto, fue el elegido para el estudio de su cadena alquílica:
 - Los LIs basados en imidazolio con cadenas alquílicas más largas están asociados a una mayor desestabilización de la ficocianina. Se ha comprobado que el motivo de esa mayor desestabilización es el aumento de la superficie de contacto del catión del LI con los aminoácidos en la superficie externa de la ficocianina que son predominantemente hidrófobos. Por lo tanto, el LI elegido para formar parte del sistema bifásico fue el [EMIM][EtSO₄].
5. Se ha demostrado que mediante el sistema ATPS con [EMIM][EtSO₄] no se ha conseguido aumentar la pureza de la ficocianina, pero sí ha resultado ventajoso en la separación de carbohidratos y lípidos del extracto crudo de ficocianina. Por lo tanto, es necesario añadir etapas de purificación adicionales como la diálisis y la precipitación

CONCLUSIONES

con sulfato de amonio. El enfoque de purificación con el que se ha alcanzado una mayor pureza de ficocianina ($4,22 \pm 0,05$), de grado analítico, fue mediante el método de purificación 2: *sistema ATPS + diálisis + precipitación*.

6. Mediante la reutilización del LI en el sistema ATPS se ha conseguido aumentar la pureza de la ficocianina hasta casi 7 veces con respecto al extracto crudo ($2,89 \pm 0,11$) en la etapa del ATPS. Sin embargo, en las etapas posteriores de diálisis y precipitación la pureza no aumentó, alcanzando un valor de pureza final de $2,72 \pm 0,01$. Por lo que, se puede concluir que la etapa más relevante para el proceso de purificación de ficocianina, cuando se reutiliza LI en el sistema ATPS, fue el sistema ATPS, ya que la mayoría de las proteínas se concentran en una fase intermedia (83%).

Aprovechamiento de la biomasa residual mediante licuefacción hidrotérmica o digestión anaerobia

Con respecto al proceso de *licuefacción hidrotérmica* (biorrefinería 1):

1. En presencia de alcoholes como cosolventes, tanto a 300°C como a 350°C , el rendimiento a bioaceite aumentó con respecto a usar agua como disolvente, excepto en el caso de usar la biomasa completa. El aumento de la temperatura de reacción afecta positivamente al rendimiento y al poder calorífico del bioaceite obtenido a partir de la biomasa residual sobre todo en presencia de cosolventes.
2. La cantidad de O de los bioaceites obtenidos se redujo con el aumento de la temperatura y con la presencia de cosolvente, ya que las reacciones de descarboxilación o descarbonilación se intensificaron con la temperatura. De igual forma sucede con el contenido en N de los bioaceites, la combinación del incremento de temperatura junto con la presencia del cosolvente fue asociado a una disminución en N cuando se utilizó biomasa residual.
3. Tanto las mayores energías recuperadas en el bioaceite como los mayores rendimientos a bioaceite se obtuvieron para la biomasa residual a 350°C y en presencia de isopropanol ($78,43 \pm 0,47\%$ y $54,9 \pm 1,1\%$ p/p, bs, respectivamente). El poder calorífico de los bioaceites obtenidos a partir de la biomasa residual en las condiciones óptimas (a 350°C y en presencia de isopropanol) fue de $39,7 \pm 0,2$ MJ/kg, muy próximo al del petróleo.
4. Es necesario añadir una etapa de hidrotratamiento posterior para reducir el contenido en O, N y S de los bioaceites producidos.

Con respecto al proceso de *digestión anaerobia* (biorrefinería 2):

1. Se obtuvieron unos resultados prometedores en condiciones mesofílicas puesto que se consiguieron valores máximos de potencial bioquímico de metano (BMP) a partir de la

CONCLUSIONES

biomasa residual con glicerol (300 mL CH₄/gSV) próximos a los que se obtenían con la biomasa completa de *Arthrospira platensis* (322 mL CH₄/gSV) en un menor tiempo.

2. Los ensayos llevados a cabo en condiciones termofílicas a partir de la biomasa residual y empleando glicerol, no resultaron exitosos. En primer lugar, no se consiguió producir la misma cantidad de metano que en condiciones mesofílicas, sino que se produjo bastante menos (171 mL CH₄/gSV) y, en segundo lugar, tampoco se consiguió reducir el tiempo de los ensayos. Esto fue debido a que el rango de temperaturas más alto, en algunas especies de microalgas, está asociado con altos niveles de amoníaco y ácidos grasos volátiles (AGV) que, a su vez, están relacionados con la falla del proceso debido a la posible inhibición de los metanógenos por parte de estos compuestos

Evaluación de los impactos ambientales de las dos biorrefinerías propuestas

1. El mayor consumo de energía se ha asociado con las etapas de cultivo, concretamente la etapa de secado/liofilización (116,6 kWh) y con el proceso de HTL (42,9 kWh), según los inventarios obtenidos mediante simulación. El resto de las etapas, en términos energéticos, no resultaron tan relevantes.
2. La etapa del secado de la biomasa fue la que más influyó, con diferencia, en casi todas las categorías de impacto, excepto en la eutrofización (29%). Tuvo contribuciones de hasta un 80% para el caso de la demanda de energía acumulada y en el agotamiento de recursos abióticos. La etapa de cultivo ha generado un gran impacto en la eutrofización, de casi un 50%. Las etapas que menos impacto generan y, por lo tanto, son menos contaminantes, fueron la extracción de ficocianina (3-8%), la diálisis (1,1%) y la precipitación (2,4%). La producción de bioaceite mediante licuefacción hidrotérmica ha generado un mayor impacto que la obtención de biogás mediante digestión anaerobia (10-30%) en todas las categorías de impacto analizadas. Esto fue debido a las condiciones de temperatura y presión mucho más severas que requiere el proceso de HTL comparado con el proceso de digestión anaerobia. Por lo que el aprovechamiento de la biomasa residual mediante digestión anaerobia (biorrefinería 2) es el escenario que menos impacto tuvo y por tanto el elegido.

5.1 Recomendaciones futuras

De la discusión de resultados y conclusiones obtenidas en el desarrollo de la presente investigación se sugieren las siguientes recomendaciones futuras con el fin de completar, avanzar y escalar el trabajo realizado en la presente tesis doctoral:

1. Añadir la etapa experimental de cultivo de *Arthrospira platensis* en los esquemas de biorrefinería propuestos. De esta forma se podrán optimizar las condiciones de cultivo (luz, temperatura, medio de cultivo, pH, etc.) que condicionen a la cianobacteria a generar más cantidad de ficocianina. Así se trabajará con biomasa fresca y optimizada para contener la máxima cantidad de ficocianina.

2. Mediante un diseño de experimentos en el sistema de dos fases acuosas (ATPS), maximizar tanto la cantidad de ficocianina obtenida en la fase superior del sistema, como su pureza. Evaluando los siguientes factores: longitud de la *tie-line*, relación de volúmenes (V_{sup}/V_{inf}) y mezclas del [EMIM][EtSO₄] con otros LIs. Analizar los efectos en el reparto de las proteínas y PC de cada uno de los factores.

3. Para el escalado del proceso a nivel industrial, la recuperación del LI mediante diálisis y la posterior eliminación parcial del agua con un rotavapor se podría sustituir por un proceso de pervaporación basado en membrana. Dicho proceso suele utilizarse a gran escala, a nivel industrial debido a que reduce el consumo de energía y los costes operativos en comparación con otros procesos industriales como la destilación. En el caso de la pervaporación una fracción del alimento líquido es selectivamente evaporado en condiciones moderadas a través de interacciones físicas-químicas entre el material de membrana y las moléculas permeantes, no se basa en la volatilidad relativa como la destilación; de esta manera se reduce significativamente la cantidad de energía necesaria frente a las tecnologías en las que toda la corriente se evapora. En concreto, dicha técnica suele ser efectiva en separaciones de agua/LI, disolvente orgánico volátil/LI o disolvente orgánico/agua [475]. Asimismo, se reducen las pérdidas de LI alcanzando mayores deshidrataciones del mismo, obteniéndolo prácticamente concentrado (~99% p/p LI).

4. Escalado del proceso de licuefacción hidrotérmica en un reactor autoclave de acero inoxidable de, al menos, 100 mL en las condiciones óptimas obtenidas en los reactores discontinuos de acero de 4,1 mL en el baño de arena.

5. Como el proceso de digestión anaerobia ha generado un impacto ambiental menor que el proceso de licuefacción hidrotérmica, evaluar el proceso de biodegradabilidad de la biomasa residual en presencia de otros cosustratos (estiércol de cerdo, estiércol de vaca, desechos sólidos municipales o desechos de papel).

CONCLUSIONES

6. Realizar un estudio de costes de todo el proceso, buscando la rentabilidad del proceso completo (desde la etapa de cultivo hasta la obtención del biocompuesto junto con los diferentes tipos de biocombustibles). Con la información de costes de los procesos anteriores, se analizará un estudio de los impactos socioeconómicos de dichos procesos.

BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

1. Hachicha, R.; Elleuch, F.; Hlima, H. Ben; Dubessay, P.; de Baynast, H.; Delattre, C.; Pierre, G.; Hachicha, R.; Abdelkafi, S.; Michaud, P.; et al. Biomolecules from Microalgae and Cyanobacteria: Applications and Market Survey. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 1924, doi:10.3390/app12041924.
2. Sajjadi, B.; Chen, W.Y.; Raman, A.A.A.; Ibrahim, S. Microalgae Lipid and Biomass for Biofuel Production: A Comprehensive Review on Lipid Enhancement Strategies and Their Effects on Fatty Acid Composition. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *97*, 200–232, doi:10.1016/j.rser.2018.07.050.
3. Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P.Y.; Vaca-Garcia, C. Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella Vulgaris*: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *35*, 265–278, doi:10.1016/j.rser.2014.04.007.
4. Singh, A.; Nigam, P.S.; Murphy, J.D. Renewable Fuels from Algae: An Answer to Debatable Land Based Fuels. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 10–16, doi:10.1016/j.biortech.2010.06.032.
5. Pignolet, O.; Jubeau, S.; Vaca-Garcia, C.; Michaud, P. Highly Valuable Microalgae: Biochemical and Topological Aspects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 781–796, doi:10.1007/s10295-013-1281-7.
6. Venkatesan, J.; Manivasagan, P.; Kim, S.K. *Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances.*; Elsevier Inc., 2015; ISBN 9780128011249.
7. Martínez-Francés, E.; Escudero-Oñate, C. Cyanobacteria and Microalgae in the Production of Valuable Bioactive Compounds. In *Microalgal Biotechnology*; IntechOpen, 2018; pp. 105–128 ISBN 978-1-78923-333-9.
8. Muñoz, C.G.-F. and R. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*; Elsevier Inc., 2018; ISBN 978-0-08-101027-3.
9. Pagels, F.; Guedes, A.C.; Vicente, A.A.; Vasconcelos, V. Cyanobacteria-Based Bioprocess for Cosmetic Products-Cyanobium Sp. as a Novel Source of Bioactive Pigments. *Phycology* **2023**, *3*, 47–64, doi:https://doi.org/10.3390/ phycology3010004.
10. Burczyk, J.; Zych, M.; Ioannidis, N.E.; Kotzabasis, K. Polyamines in Cell Walls of Chlorococcalean Microalgae. *Zeitschrift fur Naturforsch. - J. Biosci.* **2014**, *69 C*, 75–80, doi:10.5560/ZNC.2012-0215.

BIBLIOGRAFÍA

11. Alhattab, M.; Kermanshahi-Pour, A.; Brooks, M.S.L. Microalgae Disruption Techniques for Product Recovery: Influence of Cell Wall Composition. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 61–88, doi:10.1007/s10811-018-1560-9.
12. Yamada, T.; Sakaguchi, K. Comparative Studies on *Chlorella* Cell Walls: Induction of Protoplast Formation. *Arch. Microbiol.* **1982**, *132*, 10–13, doi:10.1007/BF00690809.
13. Chen, C.Y.; Zhao, X.Q.; Yen, H.W.; Ho, S.H.; Cheng, C.L.; Lee, D.J.; Bai, F.W.; Chang, J.S. Microalgae-Based Carbohydrates for Biofuel Production. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *78*, 1–10, doi:10.1016/j.bej.2013.03.006.
14. Masojíddek, J.; Torzillo, G. Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. *Ref. Modul. Earth Syst. Environ. Sci.* **2014**, 1–13, doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.09373-8.
15. L. Barsanti, P. Coltelli, V. Evangelista, A. Frassanito, V. Passarelli, N. Vesentini, P.G. Oddities and Curiosities in the Algal Word. *Algal Toxins Nature, Occur. Eff. Detect.* **2008**, 353–391, doi:10.1007/978-1-4020-8480-5_17.
16. Chhandama, M.V.L.; Satyan, K.B.; Changmai, B.; Vanlalveni, C.; Rokhum, S.L. Microalgae as a Feedstock for the Production of Biodiesel: A Review. *Bioresour. Technol. Reports* **2021**, *15*, 100771, doi:10.1016/j.biteb.2021.100771.
17. Abdel-Raouf, N.; Al-Homaidan, A.A.; Ibraheem, I.B.M. Microalgae and Wastewater Treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* **2012**, *19*, 257–275, doi:10.1016/j.sjbs.2012.04.005.
18. Li, K.; Liu, Q.; Fang, F.; Luo, R.; Lu, Q.; Zhou, W.; Huo, S.; Cheng, P.; Liu, J.; Addy, M.; et al. Microalgae-Based Wastewater Treatment for Nutrients Recovery: A Review. *Bioresour. Technol.* **2019**, *291*, 121934, doi:10.1016/j.biortech.2019.121934.
19. Md. Asraful Alam Jing-Liang Xu Zhongming Wang *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*; Springer Singapore, 2020; ISBN 9789811501685.
20. Puchkova, T.; , Sofia Khapchaeva , Vasily Zotov, A.L. and A.S. Microalgae as a Sustainable Source of Cosmeceuticals. *Mar. Biol. J.* **2020**, *6*, 67–81, doi:10.20944/preprints202012.0696.v1.
21. Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 87–96, doi:10.1263/jbb.101.87.
22. Milner, H.A.S. and H.W. The Chemical Composition of *Chlorella*; Effect of Environmental Conditions Author. *Plant Physiol.* **1949**, *24*, 120–149, doi:10.1104/pp.24.1.120.
23. Araújo, S.D.C.; Garcia, V.M.T. Growth and Biochemical Composition of the Diatom

BIBLIOGRAFÍA

- Chaetoceros Cf. Wighamii Brightwell under Different Temperature, Salinity and Carbon Dioxide Levels. I. Protein, Carbohydrates and Lipids. *Aquaculture* **2005**, *246*, 405–412, doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.051.
24. Juneja, A.; Ceballos, R.M.; Murthy, G.S. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* **2013**, *6*, 4607–4638, doi:10.3390/en6094607.
25. Wahidin, S.; Idris, A.; Shaleh, S.R.M. The Influence of Light Intensity and Photoperiod on the Growth and Lipid Content of Microalgae *Nannochloropsis* Sp. *Bioresour. Technol.* **2013**, *129*, 7–11, doi:10.1016/j.biortech.2012.11.032.
26. Sharma, Rekha, G.P.S. and V.K.S. Effects of Culture Conditions on Growth and Biochemical Profile of *Chlorella Vulgaris*. *J. Plant Pathol. Microbiol.* **2012**, *3*, 131, doi:10.4172/2157-7471.1000131.
27. Moraes, I. de O.; Arruda, R. de O.M.; Maresca, N.R.; Antunes, A. de O.; Moraes, R. de O. *Spirulina Platensis*: Process Optimization to Obtain Biomass. *Food Sci. Technol.* **2013**, *33*, 179–183, doi:10.1590/S0101-20612013000500026.
28. da Silva Ferreira, V.; Sant'Anna, C. The Effect of Physicochemical Conditions and Nutrient Sources on Maximizing the Growth and Lipid Productivity of Green Microalgae. *Phycol. Res.* **2017**, *65*, 3–13, doi:10.1111/pre.12160.
29. Delrue, F.; Alaux, E.; Moudjaoui, L.; Gaignard, C.; Fleury, G.; Perilhou, A.; Richaud, P.; Petitjean, M.; Sassi, J.F. Optimization of *Arthrospira Platensis* (*Spirulina*) Growth: From Laboratory Scale to Pilot Scale. *Fermentation* **2017**, *3*, 59, doi:10.3390/fermentation3040059.
30. de Castro, G.F.P. da S.; Rizzo, R.F.; Passos, T.S.; dos Santos, B.N.C.; Dias, D. da S.; Domingues, J.R.; Araújo, K.G. de L. Biomass Production by *Arthrospira Platensis* under Different Culture Conditions. *Food Sci. Technol.* **2015**, *35*, 18–24, doi:10.1590/1678-457X.6421.
31. Soni, R.A.; Sudhakar, K.; Rana, R.S. Comparative Study on the Growth Performance of *Spirulina Platensis* on Modifying Culture Media. *Energy Reports* **2019**, *5*, 327–336, doi:10.1016/j.egyr.2019.02.009.
32. Singh, S.P.; Singh, P. Effect of CO₂ Concentration on Algal Growth: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *38*, 172–179, doi:10.1016/j.rser.2014.05.043.
33. Miranda, C.T.; de Lima, D.V.N.; Atella, G.C.; de Aguiar, P.F.; Azevedo, S.M.F.O. Optimization of Nitrogen, Phosphorus and Salt for Lipid Accumulation of Microalgae:

BIBLIOGRAFÍA

- Towards the Viability of Microalgae Biodiesel. *Nat. Sci.* **2016**, *8*, 557–573, doi:10.4236/ns.2016.812055.
34. Hemlata; Fatma, T. Screening of Cyanobacteria for Phycobiliproteins and Effect of Different Environmental Stress on Its Yield. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2009**, *83*, 509–515, doi:10.1007/s00128-009-9837-y.
35. Christaki, E.; Bonos, E.; Florou-Paneri, P. Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*; Elsevier Inc., 2015; pp. 233–243 ISBN 9780128011249.
36. Bhattacharya, M.; Goswami, S. Microalgae – A Green Multi-Product Biorefinery for Future Industrial Prospects. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *25*, 101580, doi:10.1016/j.bcab.2020.101580.
37. Delgado-Vargas, F.; Paredes-López, O. Chemicals and Colorants as Nutraceuticals. In *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*; CRC press, 2002; p. 344 ISBN 9780429133534.
38. Portillo, F.V.; Jiménez, A.M. Pigmentos En Microalgas: Funciones, Aplicaciones y Técnicas de Sobreproducción. *Biotechnol. Soc. Mex. Biotechnol. y Bioingeniería* **2021**, *25*, 35–51.
39. Kobylewski, S.; Jacobson, M.F. Food Dyes: A Rainbow of Risks. *J. Cent. Sci. public Interes.* **2010**, *30*, 337–360.
40. Ben Mansour, H.; Corroler, D.; Barillier, D.; Ghedira, K.; Chekir, L.; Mosrati, R. Evaluation of Genotoxicity and Pro-Oxidant Effect of the Azo Dyes: Acids Yellow 17, Violet 7 and Orange 52, and of Their Degradation Products by *Pseudomonas Putida* Mt-2. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1670–1677, doi:10.1016/j.fct.2007.02.033.
41. Medvedev, Z.A.; Crowne, H.M.; Medvedeva, M.N. Age Related Variations of Hepatocarcinogenic Effect of Azo Dye (3'-MDAB) as Linked to the Level of Hepatocyte Polyploidization. *Mech. Ageing Dev.* **1988**, *46*, 159–174, doi:10.1016/0047-6374(88)90123-6.
42. Adrian J. Percy, N.M. and J.K.C. Formation of Nuclear Anomalies in Rat Intestine by Benzidine and Its Biliary Metabolites. *Toxicology* **1989**, *57*, 217–223, doi:10.1016/0300-483x(89)90167-4.
43. De Mejia, E.G., Zhang, Q., Penta, K., Eroglu, A., Lila, M.. Annual Review of Food Science and Technology. The Colors of Health: Chemistry, Bioactivity, and Market Demand for Colorful Foods and Natural Food Sources of Colorants. *Annu. Rev. Food Sci.*

BIBLIOGRAFÍA

- Technol.* **2020**, *11*, 145–182, doi:10.1146/annurev-food-032519-051729.
44. Prasanna, R.; Sood, A.; Suresh, A.; Nayak, S.; Kaushik, B.D. Potentials and Applications of Algal Pigments in Biology and Industry. *Acta Bot. Hung.* **2007**, *49*, 131–156, doi:10.1556/ABot.49.2007.1-2.14.
 45. Ferreira de Oliveira, A.P.; Bragotto, A.P.A. Microalgae-Based Products: Food and Public Health. *Futur. Foods* **2022**, *6*, 100157, doi:10.1016/j.fufo.2022.100157.
 46. Das, D. Algae as a Source of Phycocyanin and Other Industrially Important Pigments. In *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*; 2016; pp. 1–467 ISBN 978-3-319-22813-6.
 47. Mulders, K.J.M.; Lamers, P.P.; Martens, D.E.; Wijffels, R.H. Phototrophic Pigment Production with Microalgae: Biological Constraints and Opportunities. *J. Phycol.* **2014**, *50*, 229–242, doi:10.1111/jpy.12173.
 48. Sigurdson, G.T.; Tang, P.; Giusti, M.M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2017**, *8*, 261–280, doi:10.1146/annurev-food-030216-025923.
 49. Dagnino-Leone, J.; Figueroa, C.P.; Castañeda, M.L.; Youlton, A.D.; Vallejos-Almirall, A.; Agurto-Muñoz, A.; Pavón Pérez, J.; Agurto-Muñoz, C. Phycobiliproteins: Structural Aspects, Functional Characteristics, and Biotechnological Perspectives. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2022**, *20*, 1506–1527, doi:10.1016/j.csbj.2022.02.016.
 50. Eduardo Jacob-Lopes, M.I.Q.; Zepka, L.Q. *Pigments from Microalgae Handbook*; Springer Cham, 2020; ISBN 978-3-030-50971-2.
 51. Queiroz Zepka, L.; Jacob-Lopes, E.; Roca, M. Catabolism and Bioactive Properties of Chlorophylls. *Curr. Opin. Food Sci.* **2019**, *26*, 94–100, doi:10.1016/j.cofs.2019.04.004.
 52. Bryant, D.A.; Hunter, C.N.; Warren, M.J. Biosynthesis of the Modified Tetrapyrroles—the Pigments of Life. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 6888–6925, doi:10.1074/jbc.REV120.006194.
 53. Qiu, N.W.; Jiang, D.C.; Wang, X.S.; Wang, B.S.; Zhou, F. Advances in the Members and Biosynthesis of Chlorophyll Family. *Photosynthetica* **2019**, *57*, 974–984, doi:10.32615/ps.2019.116.
 54. Björn, L.O.; Papageorgiou, G.C.; Blankenship, R.E.; Govindjee A Viewpoint: Why Chlorophyll A? *Photosynth. Res.* **2009**, *99*, 85–98, doi:10.1007/s11120-008-9395-x.
 55. Panawala, L. Main Difference – Chlorophyll A vs Chlorophyll B. **2017**, 1–9.

BIBLIOGRAFÍA

56. Nethravathy, M.U.; Mehar, J.G.; Mudliar, S.N.; Shekh, A.Y. Recent Advances in Microalgal Bioactives for Food, Feed, and Healthcare Products: Commercial Potential, Market Space, and Sustainability. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 1882–1897, doi:10.1111/1541-4337.12500.
57. Miguel G. Guerrero, Herminia Rodríguez, M.A.V.; Mercedes García-González, José Antonio del Campo, J.M. y J.R. Las Microalgas Como Productoras de Pigmentos Con Interés Comercial. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 215–232.
58. Mezzomo, N.; Ferreira, S.R.S. Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. *J. Chem.* **2016**, *2016*, Article ID 3164312, 16 pages, doi:10.1155/2016/3164312.
59. Christopher Thane and Sheela Reddy Processing of Fruit and Vegetables: Effect on Carotenoids. *Nutr. Food Sci.* **1997**, *97*, 58–65, doi:10.1108/00346659710161858.
60. Moeller, S.M.; Jacques, P.F.; Blumberg, J.B. The Potential Role of Dietary Xanthophylls in Cataract and Age-Related Macular Degeneration. *J. Am. Coll. Nutr.* **2000**, *19*, 522S–527S, doi:10.1080/07315724.2000.10718975.
61. Li, W.; Su, H.N.; Pu, Y.; Chen, J.; Liu, L.N.; Liu, Q.; Qin, S. Phycobiliproteins: Molecular Structure, Production, Applications, and Prospects. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 340–353, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.01.008.
62. MacColl, R. Cyanobacterial Phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* **1998**, *124*, 311–334, doi:10.1006/jsbi.1998.4062.
63. Larkum, A.W.D.; Grossman, A.R.; Raven, J.A. *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms*; Anthony W.D. Larkum, Arthur R. Grossman, J.A.R., Ed.; Springer Cham, 2020; ISBN 978-3-030-33397-3.
64. Puzorjov, A.; McCormick, A.J. Phycobiliproteins from Extreme Environments and Their Potential Applications. *J. Exp. Bot.* **2020**, *71*, 3827–3842, doi:10.1093/jxb/eraa139.
65. Apt, K.E.; Collier, J.L.; Grossman, A.R. Evolution of the Phycobiliproteins. *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 79–96, doi:10.1006/jmbi.1995.0203.
66. Fernández-Rojas, B.; Hernández-Juárez, J.; Pedraza-Chaverri, J. Nutraceutical Properties of Phycocyanin. *J. Funct. Foods* **2014**, *11*, 375–392, doi:10.1016/j.jff.2014.10.011.
67. Stanic-Vucinic, D.; Minic, S.; Nikolic, M.R.; Velickovic, T.C. *Spirulina* Phycobiliproteins as Food Components and Complements. In *Microalgal Biotechnology*; Eduardo Jacob-Lopes, L.Q.Z. and M.I.Q., Ed.; IntechOpen, 2018; pp. 129–149 ISBN 978-1-78923-333-

- 9.
68. Padyana, A.K.; Bhat, V.B.; Madyastha, K.M.; Rajashankar, K.R.; Ramakumar, S. Crystal Structure of a Light-Harvesting Protein C-Phycocyanin from *Spirulina Platensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *282*, 893–898, doi:10.1006/bbrc.2001.4663.
69. Kannaujiya, V.K.; Kumar, D.; Singh, V.; Sinha, R.P. Advances in Phycobiliproteins Research: Innovations and Commercialization. In *Natural Bioactive Compounds*; Elsevier Inc., 2021; pp. 57–81 ISBN 9780128206553.
70. Green, B.R. Evolution of Light-Harvesting Antennas in an Oxygen World. In *Evolution of Primary Producers in the Sea*; Elsevier Inc., 2007; pp. 37–53 ISBN 9780123705181.
71. Halim, R. Industrial Extraction of Microalgal Pigments. In *Pigments from Microalgae Handbook*; Springer International, 2020; pp. 265–308 ISBN 978-3-030-50971-2.
72. Pagels, F.; Pereira, R.N.; Vicente, A.A.; Guedes, A.C. Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria-a Review on Current Methodologies. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 5187, doi:10.3390/app11115187.
73. Prozyme C-Phycocyanin (Specifications). Products. [homepage on the Internet]. USA; [Http://www.prozyme.com](http://www.prozyme.com), A. from: . **2009**.
74. Sharma, G.; Kumar, M.; Ali, M.I.; Jasuja, N.D. Effect of Carbon Content, Salinity and PH on *Spirulina Platensis* for Phycocyanin, Allophycocyanin and Phycoerythrin Accumulation. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2014**, *6*, 202–206, doi:10.4172/1948-5948.1000144.
75. Venkatraman, K.L.; Mehta, A. Health Benefits and Pharmacological Effects of Porphyra Species. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2019**, *74*, 10–17, doi:10.1007/s11130-018-0707-9.
76. Pagels, F.; Guedes, A.C.; Amaro, H.M.; Kijjoa, A.; Vasconcelos, V. Phycobiliproteins from Cyanobacteria: Chemistry and Biotechnological Applications. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 422–443, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.02.010.
77. Begum, H.; Yusoff, F.M.D.; Banerjee, S.; Khatoon, H.; Shariff, M. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, 2209–2222, doi:10.1080/10408398.2013.764841.
78. Dineshkumar, R.; Subramanian, G.; Dash, S.K.; Sen, R. Development of an Optimal Light-Feeding Strategy Coupled with Semi-Continuous Reactor Operation for Simultaneous Improvement of Microalgal Photosynthetic Efficiency, Lutein Production and CO₂ Sequestration. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *113*, 47–56,

- doi:10.1016/j.bej.2016.05.011.
79. Liu, S.; Daigger, G.T.; Kang, J.; Zhang, G. Effects of Light Intensity and Photoperiod on Pigments Production and Corresponding Key Gene Expression of *Rhodospseudomonas Palustris* in a Photobioreactor System. *Bioresour. Technol.* **2019**, *294*, 122172, doi:10.1016/j.biortech.2019.122172.
80. Keithellakpam, O.S.; Nath, T.O.; Oinam, A.S.; Thingujam, I.; Oinam, G.; Dutt, S.G. Effect of External PH on Cyanobacterial Phycobiliproteins Production and Ammonium Excretion. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* **2015**, *3*, 38–42, doi:10.7324/jabb.2015.3408.
81. Raeisossadati, M.; Moheimani, N.R.; Parlevliet, D. Red and Blue Luminescent Solar Concentrators for Increasing *Arthrospira Platensis* Biomass and Phycocyanin Productivity in Outdoor Raceway Ponds. *Bioresour. Technol.* **2019**, *291*, 121801, doi:10.1016/j.biortech.2019.121801.
82. Khattar, J.I.S.; Kaur, S.; Kaushal, S.; Singh, Y.; Singh, D.P.; Rana, S.; Gulati, A. Hyperproduction of Phycobiliproteins by the Cyanobacterium *Anabaena Fertilissima* PUPCCC 410.5 under Optimized Culture Conditions. *Algal Res.* **2015**, *12*, 463–469, doi:10.1016/j.algal.2015.10.007.
83. Del Campo, J.A.; Rodríguez, H.; Moreno, J.; Vargas, M.Á.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. Accumulation of Astaxanthin and Lutein in *Chlorella Zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 848–854, doi:10.1007/s00253-003-1510-5.
84. García-González, M.; Moreno, J.; Manzano, J.C.; Florencio, F.J.; Guerrero, M.G. Production of *Dunaliella Salina* Biomass Rich in 9-Cis- β -Carotene and Lutein in a Closed Tubular Photobioreactor. *J. Biotechnol.* **2005**, *115*, 81–90, doi:10.1016/j.jbiotec.2004.07.010.
85. Kumar, M.; Kulshreshtha, J.; Singh, G.P. Growth and Biopigment Accumulation of Cyanobacterium *Spirulina Platensis* at Different Light Intensities and Temperature. *Brazilian J. Microbiol.* **2011**, *42*, 1128–1135, doi:10.1590/S1517-838220110003000034.
86. Zhang, X.W.; Zhang, Y.M.; Chen, F. Application of Mathematical Models to the Determination Optimal Glucose Concentration and Light Intensity for Mixotrophic Culture of *Spirulina Platensis*. *Process Biochem.* **1999**, *34*, 477–481, doi:10.1016/S0032-9592(98)00114-9.
87. Zeng, X.; Danquah, M.K.; Zhang, S.; Zhang, X.; Wu, M.; Chen, X.D.; Ng, I.S.; Jing, K.; Lu, Y. Autotrophic Cultivation of *Spirulina Platensis* for CO₂ Fixation and Phycocyanin Production. *Chem. Eng. J.* **2012**, *183*, 192–197, doi:10.1016/j.cej.2011.12.062.

BIBLIOGRAFÍA

88. Del Campo, J.A.; Moreno, J.; Rodríguez, H.; Angeles Vargas, M.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. Carotenoid Content of Chlorophycean Microalgae: Factors Determining Lutein Accumulation in *Muriellopsis* Sp. (Chlorophyta). *J. Biotechnol.* **2000**, *76*, 51–59, doi:10.1016/S0168-1656(99)00178-9.
89. Liu, C.; Hu, B.; Cheng, Y.; Guo, Y.; Yao, W.; Qian, H. Carotenoids from Fungi and Microalgae: A Review on Their Recent Production, Extraction, and Developments. *Bioresour. Technol.* **2021**, *337*, 125398, doi:10.1016/j.biortech.2021.125398.
90. Çelekli, A.; Dönmez, G. Effect of PH, Light Intensity, Salt and Nitrogen Concentrations on Growth and β -Carotene Accumulation by a New Isolate of *Dunaliella* Sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *22*, 183–189, doi:10.1007/s11274-005-9017-0.
91. Christian, D.; Zhang, J.; Sawdon, A.J.; Peng, C.A. Enhanced Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus Pluvialis* Using High Carbon Dioxide Concentration and Light Illumination. *Bioresour. Technol.* **2018**, *256*, 548–551, doi:10.1016/j.biortech.2018.02.074.
92. El-Baky, H.H.A. Over Production of Phycocyanin Pigment in Blue Green Alga *Spirulina* Sp. and It's Inhibitory Effect on Growth of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *J. Med. Sci.* **2003**, *3*, 314–324, doi:10.3923/jms.2003.314.324.
93. Spence, C. What Is so Unappealing about Blue Food and Drink? *Int. J. Gastron. Food Sci.* **2018**, *14*, 1–8, doi:10.1016/j.ijgfs.2018.08.001.
94. De Jesus Raposo, M.F.; De Morais, R.M.S.C.; De Morais, A.M.M.B. Health Applications of Bioactive Compounds from Marine Microalgae. *Life Sci.* **2013**, *93*, 479–486, doi:10.1016/j.lfs.2013.08.002.
95. Buchweitz, M. *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color*; Elsevier Ltd, 2016; ISBN 978-0-08-100371-8.
96. Landim Neves, M.I.; Silva, E.K.; Meireles, M.A.A. Natural Blue Food Colorants: Consumer Acceptance, Current Alternatives, Trends, Challenges, and Future Strategies. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *112*, 163–173, doi:10.1016/j.tifs.2021.03.023.
97. Martins, N.; Roriz, C.L.; Morales, P.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Food Colorants: Challenges, Opportunities and Current Desires of Agro-Industries to Ensure Consumer Expectations and Regulatory Practices. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *52*, 1–15, doi:10.1016/j.tifs.2016.03.009.
98. Maranhão, M.V.M.; da Nóbrega, D.K.A.; Anunciação, C.E.C.; Maia, B. de A.B.; Mariano, P.V.D. Allergic Reaction to Patent Blue Dye in Breast Surgery – Case Report. *Brazilian*

BIBLIOGRAFÍA

- J. Anesthesiol.* **2016**, *66*, 433–436, doi:10.1016/j.bjane.2014.02.018.
99. Sakai, H.; Ono, K.; Tokunaga, S.; Sharmin, T.; Aida, T.M.; Mishima, K. Extraction of Natural Pigments from *Gardenia Jasminoides* J.Ellis Fruit Pulp Using CO₂-Expanded Liquids and Direct Sonication. *Separations* **2021**, *8*, 1, doi:10.3390/separations8010001.
100. Avci, S.; Haznedaroglu, B.Z. Pretreatment of Algal and Cyanobacterial Biomass for High Quality Phycocyanin Extraction. *J. Appl. Phycol.* **2022**, *34*, 2015–2026, doi:10.1007/s10811-022-02770-7.
101. Chaiklahan, R.; Chirasuwan, N.; Bunnag, B. Stability of Phycocyanin Extracted from *Spirulina* Sp.: Influence of Temperature, PH and Preservatives. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 659–664, doi:10.1016/j.procbio.2012.01.010.
102. Mishra, S.K.; Shrivastav, A.; Mishra, S. Effect of Preservatives for Food Grade C-PC from *Spirulina Platensis*. *Process Biochem.* **2008**, *43*, 339–345, doi:10.1016/j.procbio.2007.12.012.
103. Arulselvan, P.; Fard, M.T.; Tan, W.S.; Gothai, S.; Fakurazi, S.; Norhaizan, M.E.; Kumar, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, Article ID 5276130, 15 pages, doi:10.1155/2016/5276130.
104. Hirata, T.; Tanaka, M.; Ooike, M.; Tsunomura, T.; Sakaguchi, M. Antioxidant Activities of Phycocyanobilin Prepared from *Spirulina Platensis*. *J. Appl. Phycol.* **2000**, *12*, 435–439, doi:10.1023/a:1008175217194.
105. Patel, S.N.; Sonani, R.R.; Jakharia, K.; Bhastana, B.; Patel, H.M.; Chaubey, M.G.; Singh, N.K.; Madamwar, D. Antioxidant Activity and Associated Structural Attributes of Halomicronema Phycoerythrin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 359–369, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.170.
106. Bhat, V.B.; Madyastha, K.M. Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina Platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 262–266, doi:10.1006/bbrc.2001.5195.
107. Datla, P. The Wonder Molecule Called Phycocyanin. *Chennai—India: Parry Nutraceuticals* **2011**, 32726.
108. Cervantes-Llanos, M.; Lagumersindez-Denis, N.; Marín-Prida, J.; Pavón-Fuentes, N.; Falcon-Cama, V.; Piniella-Matamoros, B.; Camacho-Rodríguez, H.; Fernández-Massó, J.R.; Valenzuela-Silva, C.; Raíces-Cruz, I.; et al. Beneficial Effects of Oral Administration of C-Phycocyanin and Phycocyanobilin in Rodent Models of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Life Sci.* **2018**, *194*, 130–138, doi:10.1016/j.lfs.2017.12.032.

BIBLIOGRAFÍA

109. Jiang, L.; Wang, Y.; Yin, Q.; Liu, G.; Liu, H.; Huang, Y.; Li, B. Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. *J. Cancer* **2017**, *8*, 3416–3429, doi:10.7150/jca.21058.
110. Braithwaite, M.C.; Tyagi, C.; Tomar, L.K.; Kumar, P.; Choonara, Y.E.; Pillay, V. Nutraceutical-Based Therapeutics and Formulation Strategies Augmenting Their Efficiency to Complement Modern Medicine: An Overview. *J. Funct. Foods* **2014**, *6*, 82–99, doi:10.1016/j.jff.2013.09.022.
111. Li, Y. The Bioactivities of Phycocyanobilin from *Spirulina*. *J. Immunol. Res.* **2022**, Article ID 4008991, 8 pages, doi:10.1155/2022/4008991.
112. Zheng, J.; Inoguchi, T.; Sasaki, S.; Maeda, Y.; Mccarty, M.F.; Fujii, M.; Ikeda, N.; Kobayashi, K.; Sonoda, N.; Takayanagi, R. Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina Platensis* Protect against Diabetic Nephropathy by Inhibiting Oxidative Stress. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2013**, *304*, 110–120, doi:10.1152/ajpregu.00648.2011.
113. Han, L.K.; Li, D.X.; Xiang, L.; Gong, X.J.; Kondo, Y.; Suzuki, I.; Okuda, H. Isolation of Pancreatic Lipase Activity-Inhibitory Component of *Spirulina Platensis* and It Reduce Postprandial Triacylglycerolemia. *Yakugaku Zasshi* **2006**, *126*, 43–49, doi:10.1248/yakushi.126.43.
114. Chakdar, H.; Pabbi, S. Algal Pigments for Human Health and Cosmeceuticals. In *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*; Elsevier B.V., 2017; pp. 171–188 ISBN 978-0-444-63784-0.
115. Liu, Y.; Jovceviski, B.; Pukala, T.L. C-Phycocyanin from *Spirulina* Inhibits α -Synuclein and Amyloid- β Fibril Formation but Not Amorphous Aggregation. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 66–73, doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00610.
116. Gdara, N. Ben; Belgacem, A.; Khemiri, I.; Mannai, S.; Bitri, L. Protective Effects of Phycocyanin on Ischemia/Reperfusion Liver Injuries. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *102*, 196–202, doi:10.1016/j.biopha.2018.03.025.
117. Fabre, J.F.; Niangoran, N.U.F.; Gaignard, C.; Buso, D.; Mouloungui, Z.; Valentin, R. Extraction, Purification and Stability of C-Phycocyanin from *Arthrospira Platensis*. *Eur. Food Res. Technol.* **2022**, *248*, 1583–1599, doi:10.1007/s00217-022-03987-z.
118. Ciferri, O. Spirulina, the Edible Microorganism. *Microbiol. Rev.* **1983**, *47*, 551–578, doi:10.1128/membr.47.4.551-578.1983.
119. Auer, G.K.; Weibel, D.B. Bacterial Cell Mechanics. *Biochemistry* **2017**, *56*, 3710–3724, doi:10.1021/acs.biochem.7b00346.

BIBLIOGRAFÍA

120. Serive, B.; Kaas, R.; Bérard, J.B.; Pasquet, V.; Picot, L.; Cadoret, J.P. Selection and Optimisation of a Method for Efficient Metabolites Extraction from Microalgae. *Bioresour. Technol.* **2012**, *124*, 311–320, doi:10.1016/j.biortech.2012.07.105.
121. Furuki, T.; Maeda, S.; Imajo, S.; Hiroi, T.; Amaya, T.; Hirokawa, T.; Ito, K.; Nozawa, H. Rapid and Selective Extraction of Phycocyanin from *Spirulina Platensis* with Ultrasonic Cell Disruption. *J. Appl. Phycol.* **2003**, *15*, 319–324, doi:10.1023/A:1025118516888.
122. Martínez, J.M.; Luengo, E.; Saldaña, G.; Álvarez, I.; Raso, J. C-Phycocyanin Extraction Assisted by Pulsed Electric Field from *Arthrospira Platensis*. *Food Res. Int.* **2017**, *99*, 1042–1047, doi:10.1016/j.foodres.2016.09.029.
123. Boussiba, S.; Richmond, A.E. Isolation and Characterization of Phycocyanins from the Blue-Green Alga *Spirulina Platensis*. *Arch. Microbiol.* **1979**, *120*, 155–159, doi:10.1007/BF00409102.
124. İlter, I.; Akyıl, S.; Demirel, Z.; Koç, M.; Conk-Dalay, M.; Kaymak-Ertekin, F. Optimization of Phycocyanin Extraction from *Spirulina Platensis* Using Different Techniques. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *70*, 78–88, doi:10.1016/j.jfca.2018.04.007.
125. Tavanandi, H.A.; Mittal, R.; Chandrasekhar, J.; Raghavarao, K.S.M.S. Simple and Efficient Method for Extraction of C-Phycocyanin from Dry Biomass of *Arthrospira Platensis*. *Algal Res.* **2018**, *31*, 239–251, doi:10.1016/j.algal.2018.02.008.
126. Ventura, S.P.M.; Nobre, B.P.; Ertekin, F.; Hayes, M.; García-Vaquero, M.; Vieira, F.; Koc, M.; Gouveia, L.; Aires-Barros, M.R.; Palavra, A.M.F. Extraction of Value-Added Compounds from Microalgae. In *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*; Muñoz, C.G.-F. and R., Ed.; Elsevier, 2017; pp. 461–483 ISBN 978-0-08-101023-5.
127. Flourey, J.; Bellettre, J.; Legrand, J.; Desrumaux, A. Analysis of a New Type of High Pressure Homogeniser. A Study of the Flow Pattern. *Chem. Eng. Sci.* **2004**, *59*, 843–853, doi:10.1016/j.ces.2003.11.017.
128. Shene, C.; Monsalve, M.T.; Vergara, D.; Lienqueo, M.E.; Rubilar, M. High Pressure Homogenization of *Nannochloropsis Oculata* for the Extraction of Intracellular Components: Effect of Process Conditions and Culture Age. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2016**, *118*, 631–639, doi:10.1002/ejlt.201500011.
129. Chittapun, S.; Jonjaroen, V.; Khumrangsee, K.; Charoenrat, T. C-Phycocyanin Extraction from Two Freshwater Cyanobacteria by Freeze Thaw and Pulsed Electric Field Techniques to Improve Extraction Efficiency and Purity. *Algal Res.* **2020**, *46*, 101789,

- doi:10.1016/j.algal.2020.101789.
130. Moraes, C.C.; Sala, L.; Cerveira, G.P.; Kalil, S.J. C-Phycocyanin Extraction from *Spirulina Platensis* Wet Biomass. *Brazilian J. Chem. Eng.* **2011**, *28*, 45–49, doi:10.1590/S0104-66322011000100006.
 131. Sánchez-Laso, J.; Piera, A.; Vicente, G.; Bautista, L.F.; Rodríguez, R.; Espada, J.J. A Successful Method for Phycocyanin Extraction from *Arthrospira Platensis* Using [Emim] [EtSO₄] Ionic Liquid. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **2021**, *15*, 1638–1649, doi:10.1002/bbb.2275.
 132. Hadiyanto; Sutrisnorhadi; Sutanto, H.; Suzery, M. Phycocyanin Extraction from Microalgae *Spirulina Platensis* Assisted by Ultrasound Irradiation: Effect of Time and Temperature. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2016**, *38*, 391–398, doi:10.14456/sjst-psu.2016.51.
 133. Greenly, J.M.; Tester, J.W. Ultrasonic Cavitation for Disruption of Microalgae. *Bioresour. Technol.* **2015**, *184*, 276–279, doi:10.1016/j.biortech.2014.11.036.
 134. Hadiyanto, S.H. Response Surface Optimization of Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Phycocyanin from Microalgae *Spirulina Platensis*. *Emirates J. Food Agric.* **2016**, *28*, 227–234, doi:10.9755/ejfa.2015-05-193.
 135. Rocha, M.V.P.; de Matos, L.J.B.L.; Lima, L.P. de; Figueiredo, P.M. da S.; Lucena, I.L.; Fernandes, F.A.N.; Gonçalves, L.R.B. Ultrasound-Assisted Production of Biodiesel and Ethanol from Spent Coffee Grounds. *Bioresour. Technol.* **2014**, *167*, 343–348, doi:10.1016/j.biortech.2014.06.032.
 136. Johnson, E.M.; Kumar, K.; Das, D. Physicochemical Parameters Optimization, and Purification of Phycobiliproteins from the Isolated *Nostoc* Sp. *Bioresour. Technol.* **2014**, *166*, 541–547, doi:10.1016/j.biortech.2014.05.097.
 137. Chemat, F.; Vian, M.A.; Ravi, H.K.; Khadhraoui, B.; Hilali, S.; Perino, S.; Tixier, A.S.F. Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules* **2019**, *24*, 3007, doi:10.3390/molecules24163007.
 138. Yahya, N.A.; Attan, N.; Wahab, R.A. An Overview of Cosmeceutically Relevant Plant Extracts and Strategies for Extraction of Plant-Based Bioactive Compounds. *Food Bioprod. Process.* **2018**, *112*, 69–85, doi:10.1016/j.fbp.2018.09.002.
 139. Herrero, M.; Martín-Álvarez, P.J.; Señoráns, F.J.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. Optimization of Accelerated Solvent Extraction of Antioxidants from *Spirulina Platensis* Microalga.

BIBLIOGRAFÍA

- Food Chem.* **2005**, *93*, 417–423, doi:10.1016/j.foodchem.2004.09.037.
140. Clarke, C.J.; Tu, W.C.; Levers, O.; Bröhl, A.; Hallett, J.P. Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 747–800, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00571.
141. M.Ikeda. Public Health Problems of Urbanization. *Soc. Sci. Med.* **1992**, *41*, 977–981, doi:10.1016/0277-9536(94)00398-D.
142. Eur., D.O. la U. Directiva 2009/32/CE Del Parlamento Europeo y Del Consejo de 23 de Abril de 2009 Relativa a La Aproximación de Las Legislaciones de Los Estados Miembros Sobre Los Disolventes de Extracción Utilizados En La Fabricación de Productos Alimenticios y de Sus In. **2009**, *2009*, 3–11.
143. Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301–312, doi:10.1039/b918763b.
144. Chemat, F.; Vian, M.A.; Cravotto, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 8615–8627, doi:10.3390/ijms13078615.
145. Cañadas, R.; González-Miquel, M.; González, E.J.; Díaz, I.; Rodríguez, M. Overview of Neoteric Solvents as Extractants in Food Industry: A Focus on Phenolic Compounds Separation from Liquid Streams. *Food Res. Int.* **2020**, *136*, 109558, doi:10.1016/j.foodres.2020.109558.
146. Carpentieri, S.; Soltanipour, F.; Ferrari, G.; Pataro, G.; Donsì, F. Emerging Green Techniques for the Extraction of Antioxidants from Agri-Food by-Products as Promising Ingredients for the Food Industry. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1417, doi:10.3390/antiox10091417.
147. Rodrigues, R.D.P.; de Castro, F.C.; Santiago-Aguiar, R.S. de; Rocha, M.V.P. Ultrasound-Assisted Extraction of Phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) Platensis* Using Protic Ionic Liquids as Solvent. *Algal Res.* **2018**, *31*, 454–462, doi:10.1016/j.algal.2018.02.021.
148. Pinto, R.D.; Sousa, A.; Viana, T.A.; Pessoa, A.K.; Saraiva, R.; Ponte, M. V. Application of Protic Ionic Liquids in the Microwave-Assisted Extraction of Phycobiliproteins from *Arthrospira Platensis* with Antioxidant Activity. *Sep. Purif. Technol.* **2020**, *252*, 117448, doi:10.1016/j.seppur.2020.117448.
149. Khoo, K.S.; Chew, K.W.; Yew, G.Y.; Manickam, S.; Ooi, C.W.; Show, P.L. Integrated Ultrasound-Assisted Liquid Biphasic Flotation for Efficient Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis*. *Ultrason. Sonochem.* **2020**, *67*, 105052,

- doi:10.1016/j.ultsonch.2020.105052.
150. Khoo, K.S.; Tan, X.; Ooi, C.W.; Chew, K.W.; Leong, W.H.; Chai, Y.H.; Ho, S.H.; Show, P.L. How Does Ionic Liquid Play a Role in Sustainability of Biomass Processing? *J. Clean. Prod.* **2021**, *284*, 124772, doi:10.1016/j.jclepro.2020.124772.
151. Martins, P.L.G.; Braga, A.R.; de Rosso, V.V. Can Ionic Liquid Solvents Be Applied in the Food Industry? *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *66*, 117–124, doi:10.1016/j.tifs.2017.06.002.
152. Singh, S.K.; Savoy, A.W. Ionic Liquids Synthesis and Applications: An Overview. *J. Mol. Liq.* **2020**, *297*, 112038, doi:10.1016/j.molliq.2019.112038.
153. Ghosh, R. Discovery of Room Temperature Ionic Liquid. *Resonance* **2021**, *26*, 241–244, doi:10.1007/s12045-021-1122-3.
154. Mutelet, F.; Butet, V.; Jaubert, J.N. Application of Inverse Gas Chromatography and Regular Solution Theory for Characterization of Ionic Liquids. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 4120–4127, doi:10.1021/ie048806L.
155. Greer, A.J.; Jacquemin, J.; Hardacre, C. Industrial Applications of Ionic Liquids. *Molecules* **2020**, *25*, 5207, doi:10.3390/molecules25215207.
156. Cruz, C.; Ciach, A. Phase Transitions and Electrochemical Properties of Ionic Liquids and Ionic Liquid-Solvent Mixtures. *Molecules* **2021**, *26*, 3668, doi:10.3390/molecules26123668.
157. Welton, T. Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chem. Rev.* **1999**, *111*, 322–353, doi:10.1021/cr100194q.
158. Hallett, J.P.; Welton, T. Room-Temperature Ionic Liquids: Solvents for Synthesis and Catalysis. 2. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3508–3576, doi:10.1021/cr1003248.
159. Yavir, K.; Konieczna, K.; Marcinkowski, Ł.; Kloskowski, A. Ionic Liquids in the Microextraction Techniques: The Influence of ILs Structure and Properties. *Trends Anal. Chem.* **2020**, *130*, 115994, doi:10.1016/j.trac.2020.115994.
160. Zhang, S.; Sun, N.; He, X.; Lu, X.; Zhang, X. Physical Properties of Ionic Liquids: Database and Evaluation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2006**, *35*, 1475–1517, doi:10.1063/1.2204959.
161. Xu, C.; Cheng, Z. Thermal Stability of Ionic Liquids: Current Status and Prospects for Future Development. *Processes* **2021**, *9*, 337, doi:10.3390/pr9020337.

BIBLIOGRAFÍA

162. Quraishi, K.S.; Bustam, M.A.; Krishnan, S.; Khan, M.I.; Wilfred, C.D.; Lévêque, J.M. Thermokinetics of Alkyl Methylpyrrolidinium [NTf₂] Ionic Liquids: Effect of Alkyl Chain on Thermal Stability. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2017**, *129*, 261–270, doi:10.1007/s10973-016-5994-5.
163. Ngo, H.L.; LeCompte, K.; Hargens, L.; McEwen, A.B. Thermal Properties of Imidazolium Ionic Liquids. *Thermochim. Acta* **2000**, *357–358*, 97–102, doi:10.1016/S0040-6031(00)00373-7.
164. Aparicio, S.; Atilhan, M.; Karadas, F. Thermophysical Properties of Pure Ionic Liquids: Review of Present Situation. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2010**, *49*, 9580–9595, doi:10.1021/ie101441s.
165. Keshapolla, D.; Srinivasarao, K.; Gardas, R.L. Influence of Temperature and Alkyl Chain Length on Physicochemical Properties of Trihexyl- and Trioctylammonium Based Protic Ionic Liquids. *J. Chem. Thermodyn.* **2019**, *133*, 170–180, doi:10.1016/j.jct.2019.02.015.
166. Montalbán, M.G.; Bolívar, C.L.; Díaz Baños, F.G.; Vllora, G. Effect of Temperature, Anion, and Alkyl Chain Length on the Density and Refractive Index of 1-Alkyl-3-Methylimidazolium-Based Ionic Liquids. *J. Chem. Eng. Data* **2015**, *60*, 1986–1996, doi:10.1021/je501091q.
167. Greaves, T.L.; Drummond, C.J. Protic Ionic Liquids: Properties and Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 206–237, doi:10.1021/cr068040u.
168. Baker, S.N.; Baker, G.A.; Kane, M.A.; Bright, F. V. The Cybotactic Region Surrounding Fluorescent Probes Dissolved in 1-Butyl-3-Methylimidazolium Hexafluorophosphate: Effects of Temperature and Added Carbon Dioxide. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 9663–9668, doi:10.1021/jp0103528.
169. Guangren Yu, Dachuan Zhao, Lu Wen, Shendu Yang, and X.C. Viscosity of Ionic Liquids: Database, Observation, and Quantitative Structure-Property Relationship Analysis Guangren. *AIChE J.* **2011**, *58*, 2885–2899, doi:10.1002/aic.12786.
170. Smith, E.F.; Villar Garcia, I.J.; Briggs, D.; Licence, P. Ionic Liquids in Vacuo; Solution-Phase X-Ray Photoelectron Spectroscopy. *Chem. Commun.* **2005**, 5633–5635, doi:10.1039/b512311a.
171. Ramos, M.; Jiménez, A.; Garrigós, M.C. Il-Based Advanced Techniques for the Extraction of Value-Added Compounds from Natural Sources and Food by-Products. *Trends Anal. Chem.* **2019**, *119*, 115616, doi:10.1016/j.trac.2019.07.027.
172. Ventura, S.P.M.; E Silva, F.A.; Quental, M. V.; Mondal, D.; Freire, M.G.; Coutinho, J.A.P.

BIBLIOGRAFÍA

- Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 6984–7052, doi:10.1021/acs.chemrev.6b00550.
173. Wilkes, J.S. Properties of Ionic Liquid Solvents for Catalysis. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2004**, *214*, 11–17, doi:10.1016/j.molcata.2003.11.029.
174. Pau Loke Show, Jia Sen Tan, Sze Ying Lee, Kit Wayne Chew, Man Kee Lam, J.W.L.& S.-H.H. A Review on Microalgae Cultivation and Harvesting, and Their Biomass Extraction Processing Using Ionic Liquids. *Bioengineered* **2020**, *11*, 116–129, doi:10.1080/21655979.2020.1711626.
175. Toledo Hijo, A.A.C.; Maximo, G.J.; Costa, M.C.; Batista, E.A.C.; Meirelles, A.J.A. Applications of Ionic Liquids in the Food and Bioproducts Industries. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 5347–5369, doi:10.1021/acssuschemeng.6b00560.
176. Larriba, M.; Omar, S.; Navarro, P.; García, J.; Rodríguez, F.; Gonzalez-Miquel, M. Recovery of Tyrosol from Aqueous Streams Using Hydrophobic Ionic Liquids: A First Step towards Developing Sustainable Processes for Olive Mill Wastewater (OMW) Management. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 18751–18762, doi:10.1039/c5ra26510j.
177. Othman, Z.S.; Hassan, N.H.; Zubairi, S.I. Imidazolium-Based Ionic Liquid Binary Solvent System as an Extraction Medium in Enhancing the Rotenone Yield Extracted from Derris Elliptica Roots. In *Ionic liquids: Progress and Developments in Ionic Liquids*; Scott Handy, Ed.; IntechOpen, 2017; pp. 496–515 ISBN 978-953-51-2902-8.
178. Gao, J.; You, J.; Kang, J.; Nie, F.; Ji, H.; Liu, S. Recovery of Astaxanthin from Shrimp (*Penaeus Vannamei*) Waste by Ultrasonic-Assisted Extraction Using Ionic Liquid-in-Water Microemulsions. *Food Chem.* **2020**, *325*, 126850, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126850.
179. Murador, D.C.; Braga, A.R.C.; Martins, P.L.G.; Mercadante, A.Z.; de Rosso, V. V. Ionic Liquid Associated with Ultrasonic-Assisted Extraction: A New Approach to Obtain Carotenoids from Orange Peel. *Food Res. Int.* **2019**, *126*, 108653, doi:10.1016/j.foodres.2019.108653.
180. Liu, Z.; Qiao, L.; Gu, H.; Yang, F.; Yang, L. Development of Brønsted Acidic Ionic Liquid Based Microwave Assisted Method for Simultaneous Extraction of Pectin and Naringin from Pomelo Peels. *Sep. Purif. Technol.* **2017**, *172*, 326–337, doi:10.1016/j.seppur.2016.08.026.
181. Welton, P.W. and T. *Ionic Liquids in Synthesis, Second Edition*; 2008; ISBN

- 9783527312399.
182. Lee, S.Y.; Yong, H.H.; Lee, Y.J.; Kim, S.K.; Ahn, S. Two-Cation Competition in Ionic-Liquid-Modified Electrolytes for Lithium Ion Batteries. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13663–13667, doi:10.1021/jp051974m.
183. Kuang, D.; Wang, P.; Ito, S.; Zakeeruddin, S.M.; Grätzel, M. Stable Mesoscopic Dye-Sensitized Solar Cells Based on Tetracyanoborate Ionic Liquid Electrolyte. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7732–7733, doi:10.1021/ja061714y.
184. Sato, T.; Masuda, G.; Takagi, K. Electrochemical Properties of Novel Ionic Liquids for Electric Double Layer Capacitor Applications. *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 3603–3611, doi:10.1016/j.electacta.2004.03.030.
185. Brennecke, J.F.; Maginn, E.J. Ionic Liquids: Innovative Fluids for Chemical Processing. *AIChE J.* **2001**, *47*, 2384–2389, doi:10.1002/aic.690471102.
186. Zhao, H.; Xia, S.; Ma, P. Use of Ionic Liquids as “green” Solvents for Extractions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2005**, *80*, 1089–1096, doi:10.1002/jctb.1333.
187. Castillo Borja, F. Líquidos Iónicos: Métodos de Síntesis y Aplicaciones Ionic Liquids: Methods of Synthesis and Applications. *Concienc. Tecnológica* **2015**, *49*, 52–56.
188. Iglesias, M.; Gonzalez-Olmos, R.; Cota, I.; Medina, F. Brønsted Ionic Liquids: Study of Physico-Chemical Properties and Catalytic Activity in Aldol Condensations. *Chem. Eng. J.* **2010**, *162*, 802–808, doi:10.1016/j.cej.2010.06.008.
189. Mattedi, S.; Carvalho, P.J.; Coutinho, J.A.P.; Alvarez, V.H.; Iglesias, M. High Pressure CO₂ Solubility in N-Methyl-2-Hydroxyethylammonium Protic Ionic Liquids. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *56*, 224–230, doi:10.1016/j.supflu.2010.10.043.
190. Yasuda, T.; Watanabe, M. Protic Ionic Liquids: Fuel Cell Applications. *MRS Bull.* **2013**, *38*, 560–566, doi:10.1557/mrs.2013.153.
191. Orr, V.C.A.; Plechkova, N. V.; Seddon, K.R.; Rehmman, L. Disruption and Wet Extraction of the Microalgae *Chlorella Vulgaris* Using Room-Temperature Ionic Liquids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 591–600, doi:10.1021/acssuschemeng.5b00967.
192. Feng, L.; Chen, Z. lan. Research Progress on Dissolution and Functional Modification of Cellulose in Ionic Liquids. *J. Mol. Liq.* **2008**, *142*, 1–5, doi:10.1016/j.molliq.2008.06.007.
193. Falca, G.; Musteata, V.E.; Behzad, A.R.; Chisca, S.; Nunes, S.P. Cellulose Hollow Fibers for Organic Resistant Nanofiltration. *J. Memb. Sci.* **2019**, *586*, 151–161, doi:10.1016/j.memsci.2019.05.009.

BIBLIOGRAFÍA

194. Abo-Shady, A.M.; Mohamed, Y.A.; Lasheen, T. Chemical Composition of the Cell Wall in Some Green Algae Species. *Biol. Plant.* **1993**, *35*, 629–632, doi:10.1007/BF02928041.
195. Martins, M.; Vieira, F.A.; Correia, I.; Ferreira, R.A.S.; Abreu, H.; Coutinho, J.A.P.; Ventura, S.P.M. Recovery of Phycobiliproteins from the Red Macroalga: *Gracilaria* Sp. Using Ionic Liquid Aqueous Solutions. *Green Chem.* **2016**, *18*, 4287–4296, doi:10.1039/c6gc01059h.
196. Schröder, C. Proteins in Ionic Liquids: Current Status of Experiments and Simulations. *Top. Curr. Chem.* **2017**, *375*, doi:10.1007/s41061-017-0110-2.
197. Reslan, M.; Kayser, V. Ionic Liquids as Biocompatible Stabilizers of Proteins. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 781–793, doi:10.1007/s12551-018-0407-6.
198. Salis, A.; Ninham, B.W. Models and Mechanisms of Hofmeister Effects in Electrolyte Solutions, and Colloid and Protein Systems Revisited. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7358–7377, doi:10.1039/c4cs00144c.
199. Lim, G.S.; Zidar, J.; Cheong, D.W.; Jaenicke, S.; Klahn, M. Impact of Ionic Liquids in Aqueous Solution on Bacterial Plasma Membranes Studied with Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 10444–10459, doi:10.1021/jp5060952.
200. Gonçalves, A.R.P.; Paredes, X.; Cristino, A.F.; Santos, F.J.V.; Queirós, C.S.G.P. Ionic Liquids—a Review of Their Toxicity to Living Organisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5612, doi:10.3390/ijms22115612.
201. Montalbán, M.G.; Hidalgo, J.M.; Collado-González, M.; Díaz Baños, F.G.; Víllora, G. Assessing Chemical Toxicity of Ionic Liquids on *Vibrio Fischeri*: Correlation with Structure and Composition. *Chemosphere* **2016**, *155*, 405–414, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.04.042.
202. Delgado-Mellado, N.; Ayuso, M.; Villar-Chavero, M.M.; García, J.; Rodríguez, F. Ecotoxicity Evaluation towards *Vibrio Fischeri* of Imidazolium- and Pyridinium-Based Ionic Liquids for Their Use in Separation Processes. *SN Appl. Sci.* **2019**, *1*, doi:10.1007/s42452-019-0916-3.
203. Kusumahastuti, D.K.A.; Sihtmäe, M.; Kapitanov, I. V.; Karpichev, Y.; Gathergood, N.; Kahru, A. Toxicity Profiling of 24 L-Phenylalanine Derived Ionic Liquids Based on Pyridinium, Imidazolium and Cholinium Cations and Varying Alkyl Chains Using Rapid Screening *Vibrio Fischeri* Bioassay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *172*, 556–565, doi:10.1016/j.ecoenv.2018.12.076.
204. Helena Passos, M.G.F. and J.A.P.C. Ionic Liquids Solutions as Extractive Solvents of

- Value-Added Compounds from Biomass. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *16*, 4786–4815, doi:10.1039/C4GC00236A.
205. Weerachanchai, P.; Lee, J.M. Recyclability of an Ionic Liquid for Biomass Pretreatment. *Bioresour. Technol.* **2014**, *169*, 336–343, doi:10.1016/j.biortech.2014.06.072.
206. Zhang, L.; Cao, W.; Alvarez, P.J.J.; Qu, X.; Fu, H.; Zheng, S.; Xu, Z.; Zhu, D. Oxidized Template-Synthesized Mesoporous Carbon with PH-Dependent Adsorption Activity: A Promising Adsorbent for Removal of Hydrophilic Ionic Liquid. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *440*, 821–829, doi:10.1016/j.apsusc.2018.01.211.
207. Kröckel, J.; Kragl, U. Nanofiltration for the Separation of Nonvolatile Products from Solutions Containing Ionic Liquids. *Chem. Eng. Technol.* **2003**, *26*, 1166–1168, doi:10.1002/ceat.200301830.
208. Keith E. Gutowski, Grant A. Broker, Heather D. Willauer, Jonathan G. Huddleston, Richard P. Swatloski, John D. Holbrey, and R.D.R. Controlling the Aqueous Miscibility of Ionic Liquids: Aqueous Biphasic Systems of Water-Miscible Ionic Liquids and Water-Structuring Salts for Recycle, Metathesis, and Separations. *Am. Soc. Mech. Eng. Adv. Energy Syst. Div. AES* **2003**, *29*, 6632–6633, doi:doi.org/10.1021/ja0351802.
209. Sivasankari, S.; Vinoth, M.; Ravindran, D.; Baskar, K.; Alqarawi, A.A.; Abd_Allah, E.F. Efficacy of Red Light for Enhanced Cell Disruption and Fluorescence Intensity of Phycocyanin. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2021**, *44*, 141–150, doi:10.1007/s00449-020-02430-5.
210. Gan, Q.; Xue, M.; Rooney, D. A Study of Fluid Properties and Microfiltration Characteristics of Room Temperature Ionic Liquids [C10-Min][NTf2] and N8881[NTf2] and Their Polar Solvent Mixtures. *Sep. Purif. Technol.* **2006**, *51*, 185–192, doi:10.1016/j.seppur.2006.01.011.
211. Wang, J.; Luo, J.; Zhang, X.; Wan, Y. Concentration of Ionic Liquids by Nanofiltration for Recycling: Filtration Behavior and Modeling. *Sep. Purif. Technol.* **2016**, *165*, 18–26, doi:10.1016/j.seppur.2016.03.042.
212. Haerens, K.; Van Deuren, S.; Matthijs, E.; Van der Bruggen, B. Challenges for Recycling Ionic Liquids by Using Pressure Driven Membrane Processes. *Green Chem.* **2010**, *12*, 2182–2188, doi:10.1039/c0gc00406e.
213. Sun, J.; Shi, J.; Murthy Konda, N.V.S.N.; Campos, D.; Liu, D.; Nemser, S.; Shamshina, J.; Dutta, T.; Berton, P.; Gurau, G.; et al. Efficient Dehydration and Recovery of Ionic Liquid after Lignocellulosic Processing Using Pervaporation. *Biotechnol. Biofuels* **2017**,

BIBLIOGRAFÍA

- 10, 154, doi:10.1186/s13068-017-0842-9.
214. Ashaolu, T.J.; Samborska, K.; Lee, C.C.; Tomas, M.; Capanoglu, E.; Tarhan, Ö.; Taze, B.; Jafari, S.M. Phycocyanin, a Super Functional Ingredient from Algae; Properties, Purification Characterization, and Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *193*, 2320–2331, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.11.064.
215. da Silva Figueira, F.; Moraes, C.C.; Kalil, S.J. C-Phycocyanin Purification: Multiple Processes for Different Applications. *Brazilian J. Chem. Eng.* **2018**, *35*, 1117–1128, doi:10.1590/0104-6632.20180353s20170160.
216. Amarante, M.C.A. de; Corrêa Júnior, L.C.S.; Sala, L.; Kalil, S.J. Analytical Grade C-Phycocyanin Obtained by a Single-Step Purification Process. *Process Biochem.* **2020**, *90*, 215–222, doi:10.1016/j.procbio.2019.11.020.
217. 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.* **2014**, *371*, 67–74, doi:10.1016/j.fluid.2014.03.009.
218. Iqbal, M.; Tao, Y.; Xie, S.; Zhu, Y.; Chen, D.; Wang, X.; Huang, L.; Peng, D.; Sattar, A.; Shabbir, M.A.B.; et al. Aqueous Two-Phase System (ATPS): An Overview and Advances in Its Applications. *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, 18, doi:10.1186/s12575-016-0048-8.
219. Chang, Y.K.; Show, P.L.; Lan, J.C.W.; Tsai, J.C.; Huang, C.R. Isolation of C-Phycocyanin from *Spirulina Platensis* Microalga Using Ionic Liquid Based Aqueous Two-Phase System. *Bioresour. Technol.* **2018**, *270*, 320–327, doi:10.1016/j.biortech.2018.07.138.
220. Sun, Y.; Shi, Q.H.; Zhang, L.; Zhao, G.F.; Liu, F.F. Adsorption and Chromatography. In *Comprehensive Biotechnology*; Moo-Young, M., Ed.; Elsevier, 2011; Vol. 2, pp. 739–753 ISBN 9780444640475.
221. Patel, A.; Mishra, S.; Pawar, R.; Ghosh, P.K. Purification and Characterization of C-Phycocyanin from Cyanobacterial Species of Marine and Freshwater Habitat. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *40*, 248–255, doi:10.1016/j.pep.2004.10.028.
222. Chen, K.H.; Wang, S.S.S.; Show, P.L.; Hsu, S.L.; Chang, Y.K. Rapid and Efficient Recovery of C-Phycocyanin from Highly Turbid *Spirulina Platensis* Algae Using Stirred Fluidized Bed Ion Exchange Chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **2019**, *209*, 636–645, doi:10.1016/j.seppur.2018.08.057.
223. Murray Moo-Young, Michael Butler, Colin Webb, Antonio Moreira, Bernard Grodzinski, Z F Cui, S.A. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*; Elsevier, 2011; ISBN 9780080885049.

BIBLIOGRAFÍA

224. Prapulla, S.G.; Karanth, N.G. Fermentation (Industrial): Recovery of Metabolites. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*; Elsevier, 2014; Vol. 2, pp. 822–833 ISBN 9780123847331.
225. Chaiklahan, R.; Chirasuwan, N.; Loha, V.; Tia, S.; Bunnag, B. Stepwise Extraction of High-Value Chemicals from *Arthrospira (Spirulina)* and an Economic Feasibility Study. *Biotechnol. Reports* **2018**, *20*, e00280, doi:10.1016/j.btre.2018.e00280.
226. Corrêa, P.S.; Júnior, W.G.M.; Mata, and T.M. Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods. **2021**, 1–43, doi:10.3390/pr9010010.
227. Duong-Ly, K.C.; Gabelli, S.B. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. In *Methods in Enzymology*; Elsevier Inc., 2014; Vol. 541, pp. 85–94 ISBN 9780124201194.
228. Julianti, E.; Susanti; Singgih, M.; Neti Mulyani, L. Optimization of Extraction Method and Characterization of Phycocyanin Pigment from *Spirulina Platensis*. *J. Math. Fundam. Sci.* **2019**, *51*, 168–176, doi:10.5614/j.math.fund.sci.2019.51.2.6.
229. Silva, L.A.; Kuhn, K.R.; Moraes, C.C.; Burkert, C.A.V.; Kalil, S.J. Experimental Design as a Tool for Optimization of C-Phycocyanin Purification by Precipitation from *Spirulina Platensis*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 5–12, doi:10.1590/S0103-50532009000100003.
230. Ciarán Ó'Fágáin, Philip M. Cummins, and B.F.O. Gel-Filtration Chromatography. In *Protein Chromatography: Methods and Protocols*; Dermot Walls, S.T.L., Ed.; Springer, 2017; Vol. 1485, p. 423 ISBN 9781493964109.
231. Albertsson, P.-A. Partition of Proteins in Liquid Polymer–Polymer Two-Phase Systems. *Nature* **1958**, *182*, 709–711, doi:10.1038/182709a0.
232. *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols*; Hatti-Kaul, R., Ed.; Humana Totowa, NJ, 2000; ISBN 978-0-89603-541-6.
233. Raja, S.; Murty, V.R.; Thivaharan, V.; Rajasekar, V.; Ramesh, V. Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. *Sci. Technol.* **2011**, *1*, 7–16, doi:10.5923/j.scit.20110101.02.
234. Ao, G.; Streit, J.K.; Fagan, J.A.; Zheng, M. Differentiating Left- and Right-Handed Carbon Nanotubes by DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 16677–16685, doi:10.1021/jacs.6b09135.
235. Hamta, A.; Dehghani, M.R. Application of Polyethylene Glycol Based Aqueous Two-Phase Systems for Extraction of Heavy Metals. *J. Mol. Liq.* **2017**, *231*, 20–24,

- doi:10.1016/j.molliq.2017.01.084.
236. Asenjo, J.A.; Andrews, B.A. Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation: A Perspective. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 8826–8835, doi:10.1016/j.chroma.2011.06.051.
237. Grilo, A.L.; Aires-Barros, M.R.; Azevedo, A.M. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. *Sep. Purif. Rev.* **2016**, *45*, 68–80, doi:10.1080/15422119.2014.983128.
238. Suarez Garcia, E.; Suarez Ruiz, C.A.; Tilaye, T.; Eppink, M.H.M.; Wijffels, R.H.; van den Berg, C. Fractionation of Proteins and Carbohydrates from Crude Microalgae Extracts Using an Ionic Liquid Based-Aqueous Two Phase System. *Sep. Purif. Technol.* **2018**, *204*, 56–65, doi:10.1016/j.seppur.2018.04.043.
239. Yau, Y.K.; Ooi, C.W.; Ng, E.P.; Lan, J.C.W.; Ling, T.C.; Show, P.L. Current Applications of Different Type of Aqueous Two-Phase Systems. *Bioresour. Bioprocess.* **2015**, *2*, Article number 49, doi:10.1186/s40643-015-0078-0.
240. 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, doi:10.1016/S0378-4347(97)00594-X.
241. Show, P.L.; Ooi, C.W.; Anuar, M.S.; Ariff, A.; Yusof, Y.A.; Chen, S.K.; Annuar, M.S.M.; Ling, T.C. Recovery of Lipase Derived from Burkholderia Cenocepacia ST8 Using Sustainable Aqueous Two-Phase Flotation Composed of Recycling Hydrophilic Organic Solvent and Inorganic Salt. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *110*, 112–118, doi:10.1016/j.seppur.2013.03.018.
242. Lee, S.Y.; Khoiroh, I.; Ooi, C.W.; Ling, T.C.; Show, P.L. Recent Advances in Protein Extraction Using Ionic Liquid-Based Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Rev.* **2017**, *46*, 291–304, doi:10.1080/15422119.2017.1279628.
243. Ruiz-Ruiz, F.; Benavides, J.; Aguilar, O.; Rito-Palomares, M. Aqueous Two-Phase Affinity Partitioning Systems: Current Applications and Trends. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1244*, 1–13, doi:10.1016/j.chroma.2012.04.077.
244. Freire, M.G.; Cláudio, A.F.M.; Araújo, J.M.M.; Coutinho, J.A.P.; Marrucho, I.M.; Canongia Lopes, J.N.; Rebelo, L.P.N. Aqueous Biphasic Systems: A Boost Brought about by Using Ionic Liquids. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4966–4995, doi:10.1039/c2cs35151j.
245. Jorge F.B. Pereira, J.A.P.C. Aqueous Two-Phase Systems. In *Liquid-Phase Extraction A volume in Handbooks in Separation Science*; Poole, C.F., Ed.; Elsevier, 2020; pp. 157–

- 182 ISBN 9780128169117.
246. Czajkowska-Żelazko, J.F. and A. Ionic Liquids in Separation Techniques. In *Applications of Ionic Liquids in Science and Technology*; Handy, S., Ed.; 2011; p. 530 ISBN 978-953-307-605-8.
247. Li, S.; He, C.; Liu, H.; Li, K.; Liu, F. Ionic Liquid-Based Aqueous Two-Phase System, a Sample Pretreatment Procedure Prior to High-Performance Liquid Chromatography of Opium Alkaloids. *J. Chromatogr. B* **2005**, *826*, 58–62, doi:10.1016/j.jchromb.2005.08.005.
248. 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, doi:10.1007/s11426-010-4025-9.
249. McQueen, L.; Lai, D. Ionic Liquid Aqueous Two-Phase Systems from a Pharmaceutical Perspective. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 135, doi:10.3389/fchem.2019.00135.
250. Santos, J.H.P.M.; Trigo, J.P.; Maricato, É.; Nunes, C.; Coimbra, M.A.; Ventura, S.P.M. Fractionation of *Isochrysis Galbana* Proteins, Arabinans, and Glucans Using Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6*, 14042–14053, doi:10.1021/acssuschemeng.8b02597.
251. 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, doi:10.1016/j.bej.2009.05.005.
252. Oppermann, S.; Stein, F.; Kragl, U. Ionic Liquids for Two-Phase Systems and Their Application for Purification, Extraction and Biocatalysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 493–499, doi:10.1007/s00253-010-2933-4.
253. Martin, A.H.; Nieuwland, M.; De Jong, G.A.H. Characterization of Heat-Set Gels from RuBisCO in Comparison to Those from Other Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10783–10791, doi:10.1021/jf502905g.
254. Desai, R.K.; Streefland, M.; Wijffels, R.H.; Eppink, M.H.M. Extraction and Stability of Selected Proteins in Ionic Liquid Based Aqueous Two Phase Systems. *Green Chem.* **2014**, *16*, 2670–2679, doi:10.1039/c3gc42631a.
255. Zhang, X.; Zhang, F.; Luo, G.; Yang, S.; Wang, D. Extraction and Separation of Phycocyanin from *Spirulina* Using Aqueous Two-Phase Systems of Ionic Liquid and Salt. *J. Food Nutr. Res.* **2015**, *3*, 15–19, doi:10.12691/jfnr-3-1-3.

BIBLIOGRAFÍA

256. Silveira, S.T.; De Menezes Quines, L.K.; Burkert, C.A.V.; Kalil, S.J. Separation of Phycocyanin from *Spirulina Platensis* Using Ion Exchange Chromatography. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *31*, 477–482, doi:10.1007/s00449-007-0185-1.
257. Barani, A.; Pirdashti, M.; Heidari, Z.; Dragoi, E.N. Influence of the Molecular Weight of Polymer, Temperature and PH on Phase Diagrams of Poly (Ethylene Glycol) + Di-Potassium Tartrate Aqueous Two-Phase Systems. *Fluid Phase Equilib.* **2018**, *459*, 1–9, doi:10.1016/j.fluid.2017.11.037.
258. Glyk, A.; Scheper, T.; Beutel, S. Influence of Different Phase-Forming Parameters on the Phase Diagram of Several PEG-Salt Aqueous Two-Phase Systems. *J. Chem. Eng. Data* **2014**, *59*, 850–859, doi:10.1021/je401002w.
259. Yan, B.; Cao, X. Phase Diagram of Novel Recycling Aqueous Two-Phase Systems Composed of Two PH-Response Polymers: Experiment and Modeling. *Fluid Phase Equilib.* **2014**, *364*, 42–47, doi:10.1016/j.fluid.2013.11.037.
260. 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. A Eur. J.* **2007**, *13*, 2130–2137, doi:10.1002/chem.200601234.
261. Chaudry, S.; Bahri, P.A.; Moheimani, N.R. Pathways of Processing of Wet Microalgae for Liquid Fuel Production: A Critical Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *52*, 1240–1250, doi:10.1016/j.rser.2015.08.005.
262. Fan, L.; Zhang, H.; Li, J.; Wang, Y.; Leng, L.; Li, J.; Yao, Y.; Lu, Q.; Yuan, W.; Zhou, W. Algal Biorefinery to Value-Added Products by Using Combined Processes Based on Thermochemical Conversion: A Review. *Algal Res.* **2020**, *47*, 101819, doi:10.1016/j.algal.2020.101819.
263. Choo, M.Y.; Oi, L.E.; Ling, T.C.; Ng, E.P.; Lee, H.V.; Juan, J.C. Conversion of Microalgae Biomass to Biofuels. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*; Elsevier Inc., 2020; pp. 149–161 ISBN 9780128175361.
264. Liu, Z.; Ciais, P.; Deng, Z.; Lei, R.; Davis, S.J.; Feng, S.; Zheng, B.; Cui, D.; Dou, X.; Zhu, B.; et al. Near-Real-Time Monitoring of Global CO₂ Emissions Reveals the Effects of the COVID-19 Pandemic. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5172, doi:10.1038/s41467-020-18922-7.
265. Kumar, A.; Singh, P.; Raizada, P.; Hussain, C.M. Impact of COVID-19 on Greenhouse Gases Emissions: A Critical Review. *Sci. Total Environ.* **2022**, *806*, 150349, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150349.

BIBLIOGRAFÍA

266. Peng Jiang, Yee Van Fan, J.J.K. Impacts of COVID-19 on Energy Demand and Consumption: Challenges, Lessons and Emerging Opportunities. *2021 ASEM Virtual Int. Annu. Conf. "Engineering Manag. New Norm.* **2021**, 285, 116441, doi:10.1016/j.apenergy.2021.116441.
267. BP Statistical Review of World Energy 2021 70th Edition. **2021**, 70, 1–70.
268. BP Statistical Review of World Energy 2022 71th Edition. **2022**, 1–57.
269. Aktar, M.A.; Alam, M.M.; Al-Amin, A.Q. Global Economic Crisis, Energy Use, CO2 Emissions, and Policy Roadmap amid COVID-19. *Sustain. Prod. Consum.* **2021**, 26, 770–781, doi:10.1016/j.spc.2020.12.029.
270. Huang, M.T.; Zhai, P.M. Achieving Paris Agreement Temperature Goals Requires Carbon Neutrality by Middle Century with Far-Reaching Transitions in the Whole Society. *Adv. Clim. Chang. Res.* **2021**, 12, 281–286, doi:10.1016/j.accre.2021.03.004.
271. IPCC Summary for Policymakers. In: Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the Impacts of Global Warming of 1.5°C above Pre-Industrial Levels and Related Global Greenhouse Gas Emission Pathways. **2018**, 3–24, doi:10.1017/9781009157940.001.
272. Azarkamand, S.; Wooldridge, C.; Darbra, R.M. Review of Initiatives and Methodologies to Reduce CO2 Emissions and Climate Change Effects in Ports. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, 17, 3858, doi:10.3390/ijerph17113858.
273. Montoya, F.G.; Aguilera, M.J.; Manzano-Agugliaro, F. Renewable Energy Production in Spain: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, 33, 509–531, doi:10.1016/j.rser.2014.01.091.
274. Nguyen, K.H.; Kakinaka, M. Renewable Energy Consumption, Carbon Emissions, and Development Stages: Some Evidence from Panel Cointegration Analysis. *Renew. Energy* **2019**, 132, 1049–1057, doi:10.1016/j.renene.2018.08.069.
275. Dormido, L.; Garrido, I.; Hotellerie-fallois, P.L.; Santillán, J. El Cambio Climático y La Sostenibilidad Del Crecimiento: Iniciativas Internacionales y Políticas Europeas. Documentos Ocasionales N.º 2213. **2022**.
276. Directiva 2001/77/CE Del Parlamento Europeo y Del Consejo de 27 de Septiembre de 2001, Relativa a La Promoción de La Electricidad Generada a Partir de Fuentes de Energía Renovables En El Mercado Interior de La Electricidad. *Eur., D. Of. la Unión* **2001**, 33–40.

BIBLIOGRAFÍA

277. Directiva 2009/28/CE Del Parlamento Europeo y Del Consejo de 23 de Abril de 2009 Relativa Al Fomento Del Uso de Energía Procedente de Fuentes Renovables y Por La Que Se Modifican y Se Derogan Las Directivas 2001/77/CE y 2003/30/CE. *Eur., D. Of. la Unión* **2009**, 16–62.
278. Directiva (UE) 2018/2001 Del Parlamento Europeo y Del Consejo de 11 de Diciembre de 2018 Relativa Al Fomento Del Uso de Energía Procedente de Fuentes Renovables (Versión Refundida). *D. Of. la Unión Eur.* **2018**, 82–209.
279. Reglamento (UE) 2021/1229 Del Parlamento Europeo y Del Consejo de 14 de Julio de 2021 Relativo Al Instrumento de Préstamo Al Sector Público En El Marco Del Mecanismo Para Una Transición Justa. *D. Of. la Unión Eur.* **2021**, 1–19.
280. Cuesta, H.Á. Transición Justa y Lucha Contra El Cambio Climático En El Pacto Verde Europeo En El Proyecto de Ley de Cambio Climático En España. *USLabor. Rev. d'anàlisi Dret del Treb.* **2020**, 2, 74–100, doi:10.31009/IUSLabor.2020.i02.04.
281. 121/000019 Proyecto de Ley de Cambio Climático y Transición Energética. *Boletín Of. las Cortes Gen.* **2021**, 1–40.
282. Chen, W.H.; Lin, B.J.; Huang, M.Y.; Chang, J.S. Thermochemical Conversion of Microalgal Biomass into Biofuels: A Review. *Bioresour. Technol.* **2015**, 184, 314–327, doi:10.1016/j.biortech.2014.11.050.
283. Hajilary, N.; Rezakazemi, M.; Shirazian, S. Biofuel Types and Membrane Separation. *Environ. Chem. Lett.* **2019**, 17, 1–18, doi:10.1007/s10311-018-0777-9.
284. Brennan, L.; Owende, P. Biofuels from Microalgae-A Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-Products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, 14, 557–577, doi:10.1016/j.rser.2009.10.009.
285. Siddiki, S.Y.A.; Mofijur, M.; Kumar, P.S.; Ahmed, S.F.; Inayat, A.; Kusumo, F.; Badruddin, I.A.; Khan, T.M.Y.; Nghiem, L.D.; Ong, H.C.; et al. Microalgae Biomass as a Sustainable Source for Biofuel, Biochemical and Biobased Value-Added Products: An Integrated Biorefinery Concept. *Fuel* **2022**, 307, 121782, doi:10.1016/j.fuel.2021.121782.
286. Naik, S.N.; Goud, V. V.; Rout, P.K.; Dalai, A.K. Production of First and Second Generation Biofuels: A Comprehensive Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, 14, 578–597, doi:10.1016/j.rser.2009.10.003.
287. Liew, W.H.; Hassim, M.H.; Ng, D.K.S. Review of Evolution, Technology and Sustainability Assessments of Biofuel Production. *J. Clean. Prod.* **2014**, 71, 11–29, doi:10.1016/j.jclepro.2014.01.006.

BIBLIOGRAFÍA

288. Dahman, Y.; Syed, K.; Begum, S.; Roy, P.; Mohtasebi, B. Biofuels: Their Characteristics and Analysis. In *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy: Construction, Biomedical, and other Industrial Applications*; Elsevier Ltd, 2019; pp. 277–325 ISBN 9780081024263.
289. Li, Y.; Horsman, M.; Wu, N.; Lan, C.Q.; Dubois-Calero, N. Biofuels from Microalgae. *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 815–820, doi:10.1021/bp.070371k.
290. Taher, H.; Al-Zuhair, S.; Al-Marzouqi, A.H.; Haik, Y.; Farid, M. Effective Extraction of Microalgae Lipids from Wet Biomass for Biodiesel Production. *Biomass and Bioenergy* **2014**, *66*, 159–167, doi:10.1016/j.biombioe.2014.02.034.
291. Abdullah, B.; Syed Muhammad, S.A.F. ad; Shokravi, Z.; Ismail, S.; Kassim, K.A.; Mahmood, A.N.; Aziz, M.M.A. Fourth Generation Biofuel: A Review on Risks and Mitigation Strategies. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2019**, *107*, 37–50, doi:10.1016/j.rser.2019.02.018.
292. Dragone, G.; Fernandes, B.; Vicente, A.; Teixeira, J. Third Generation Biofuels from Microalgae. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* **2010**, 1355–1366.
293. Thanigaivel, S.; Priya, A.K.; Dutta, K.; Rajendran, S.; Vasseghian, Y. Engineering Strategies and Opportunities of next Generation Biofuel from Microalgae: A Perspective Review on the Potential Bioenergy Feedstock. *Fuel* **2022**, *312*, 122827, doi:10.1016/j.fuel.2021.122827.
294. Azizi, K.; Keshavarz Moraveji, M.; Abedini Najafabadi, H. A Review on Bio-Fuel Production from Microalgal Biomass by Using Pyrolysis Method. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *82*, 3046–3059, doi:10.1016/j.rser.2017.10.033.
295. Zhang, J.; Zhang, X. The Thermochemical Conversion of Biomass into Biofuels. In *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy: Construction, Biomedical, and other Industrial Applications*; Elsevier Ltd, 2019; pp. 327–368 ISBN 9780081024263.
296. Osman, A.I.; Mehta, N.; Elgarahy, A.M.; Al-Hinai, A.; Al-Muhtaseb, A.H.; Rooney, D.W. Conversion of Biomass to Biofuels and Life Cycle Assessment: A Review. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19*, 4075–4118, doi:10.1007/s10311-021-01273-0.
297. Mathimani, T.; Baldinelli, A.; Rajendran, K.; Prabakar, D.; Matheswaran, M.; Pieter van Leeuwen, R.; Pugazhendhi, A. Review on Cultivation and Thermochemical Conversion of Microalgae to Fuels and Chemicals: Process Evaluation and Knowledge Gaps. *J. Clean. Prod.* **2019**, *208*, 1053–1064, doi:10.1016/j.jclepro.2018.10.096.

BIBLIOGRAFÍA

298. Sikarwar, V.S.; Zhao, M.; Clough, P.; Yao, J.; Zhong, X.; Memon, M.Z.; Shah, N.; Anthony, E.J.; Fennell, P.S. An Overview of Advances in Biomass Gasification. *Energy Environ. Sci.* **2016**, *9*, 2939–2977, doi:10.1039/c6ee00935b.
299. Suali, E.; Sarbatly, R. Conversion of Microalgae to Biofuel. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, *16*, 4316–4342, doi:10.1016/j.rser.2012.03.047.
300. Miao, X.; Wu, Q.; Yang, C. Fast Pyrolysis of Microalgae to Produce Renewable Fuels. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2004**, *71*, 855–863, doi:10.1016/j.jaap.2003.11.004.
301. Saiyud, N.; Deethayat, T.; Asanakham, A.; Duongbia, N.; Kamopas, W.; Kiatsiriroat, T. Biochar Production from Co-Pyrolysis of Coffee Ground and Native Microalgae Consortium. *Biomass Convers. Biorefinery* **2022**, doi:10.1007/s13399-022-02954-8.
302. Bennion, E.P.; Ginosar, D.M.; Moses, J.; Agblevor, F.; Quinn, J.C. Lifecycle Assessment of Microalgae to Biofuel: Comparison of Thermochemical Processing Pathways. *Appl. Energy* **2015**, *154*, 1062–1071, doi:10.1016/j.apenergy.2014.12.009.
303. Zhang, C.; Ho, S.H.; Chen, W.H.; Xie, Y.; Liu, Z.; Chang, J.S. Torrefaction Performance and Energy Usage of Biomass Wastes and Their Correlations with Torrefaction Severity Index. *Appl. Energy* **2018**, *220*, 598–604, doi:10.1016/j.apenergy.2018.03.129.
304. Kumar, G.; Shobana, S.; Chen, W.H.; Bach, Q.V.; Kim, S.H.; Atabani, A.E.; Chang, J.S. A Review of Thermochemical Conversion of Microalgal Biomass for Biofuels: Chemistry and Processes. *Green Chem.* **2017**, *19*, 44–67, doi:10.1039/c6gc01937d.
305. Basu, P. Torrefaction. In *Biomass Gasification, Pyrolysis and Torrefaction*; Elsevier Inc., 2013; pp. 87–145 ISBN 978-0-12-396488-5.
306. Sharma, R.; Jasrotia, K.; Singh, N.; Ghosh, P.; Srivastava, S.; Sharma, N.R.; Singh, J.; Kanwar, R.; Kumar, A. A Comprehensive Review on Hydrothermal Carbonization of Biomass and Its Applications. *Chem. Africa* **2019**, *3*, 1–19, doi:10.1007/s42250-019-00098-3.
307. Gu, X.; Martinez-Fernandez, J.S.; Pang, N.; Fu, X.; Chen, S. Recent Development of Hydrothermal Liquefaction for Algal Biorefinery. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2020**, *121*, 109707, doi:10.1016/j.rser.2020.109707.
308. Guo, Y.; Yeh, T.; Song, W.; Xu, D.; Wang, S. A Review of Bio-Oil Production from Hydrothermal Liquefaction of Algae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *48*, 776–790, doi:10.1016/j.rser.2015.04.049.
309. Kruse, A.; Funke, A.; Titirici, M.M. Hydrothermal Conversion of Biomass to Fuels and

BIBLIOGRAFÍA

- Energetic Materials. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 515–521, doi:10.1016/j.cbpa.2013.05.004.
310. Aliyu, A.; Lee, J.G.M.; Harvey, A.P. Microalgae for Biofuels: A Review of Thermochemical Conversion Processes and Associated Opportunities and Challenges. *Bioresour. Technol. Reports* **2021**, *15*, 100694, doi:10.1016/j.biteb.2021.100694.
311. Onwudili, J.A.; Lea-Langton, A.R.; Ross, A.B.; Williams, P.T. Catalytic Hydrothermal Gasification of Algae for Hydrogen Production: Composition of Reaction Products and Potential for Nutrient Recycling. *Bioresour. Technol.* **2013**, *127*, 72–80, doi:10.1016/j.biortech.2012.10.020.
312. Libra, J.A.; Ro, K.S.; Kammann, C.; Funke, A.; Berge, N.D.; Neubauer, Y.; Titirici, M.M.; Fühner, C.; Bens, O.; Kern, J.; et al. Hydrothermal Carbonization of Biomass Residuals: A Comparative Review of the Chemistry, Processes and Applications of Wet and Dry Pyrolysis. *Biofuels* **2011**, *2*, 71–106, doi:10.4155/bfs.10.81.
313. López Barreiro, D.; Prins, W.; Ronsse, F.; Brilman, W. Hydrothermal Liquefaction (HTL) of Microalgae for Biofuel Production: State of the Art Review and Future Prospects. *Biomass and Bioenergy* **2013**, *53*, 113–127, doi:10.1016/j.biombioe.2012.12.029.
314. Heilmann, S.M.; Davis, H.T.; Jader, L.R.; Lefebvre, P.A.; Sadowsky, M.J.; Schendel, F.J.; von Keitz, M.G.; Valentas, K.J. Hydrothermal Carbonization of Microalgae. *Biomass and Bioenergy* **2010**, *34*, 875–882, doi:10.1016/j.biombioe.2010.01.032.
315. Mian, A.; Ensinas, A. V.; Marechal, F. Multi-Objective Optimization of SNG Production from Microalgae through Hydrothermal Gasification. *Comput. Chem. Eng.* **2015**, *76*, 170–183, doi:10.1016/j.compchemeng.2015.01.013.
316. Patil, V.; Tran, K.Q.; Gislerød, H.R. Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 1188–1195, doi:10.3390/ijms9071188.
317. Sheehan, J.D.; Savage, P.E. Modeling the Effects of Microalga Biochemical Content on the Kinetics and Biocrude Yields from Hydrothermal Liquefaction. *Bioresour. Technol.* **2017**, *239*, 144–150, doi:10.1016/j.biortech.2017.05.013.
318. Fang, Y.R.; Yeh, Y.; Liu, H.S. A Novel Strategy of Biodiesel Production from Wet Microalgae by Direct Saponification–Esterification Conversion (DSEC). *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2018**, *83*, 23–31, doi:10.1016/j.jtice.2017.12.001.
319. Nieves-Soto, M.; M., O.; Alberto, C.; Antonio, M.; Viveros-Garca, T.; Contreras-Andrade, I. Biodiesel Current Technology: Ultrasonic Process a Realistic Industrial Application. In *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*; IntechOpen, 2013;

-
- pp. 177–207 ISBN 978-953-51-0910-5.
320. Banchemo, M.; Gozzelino, G. A Simple Pseudo-Homogeneous Reversible Kinetic Model for the Esterification of Different Fatty Acids with Methanol in the Presence of Amberlyst-15. *Energies* **2018**, *11*, 1843, doi:10.3390/en11071843.
321. Lee, S.M.; Lee, J.H. Ethanol Fermentation for Main Sugar Components of Brown-Algae Using Various Yeasts. *J. Ind. Eng. Chem.* **2012**, *18*, 16–18, doi:10.1016/j.jiec.2011.11.097.
322. Offei, F.; Mensah, M.; Thygesen, A.; Kemausuor, F. Seaweed Bioethanol Production: A Process Selection Review on Hydrolysis and Fermentation. *Fermentation* **2018**, *4*, 99, doi:10.3390/fermentation4040099.
323. Veillette, M.; Giroir-Fendler, A.; Faucheux, N.; Heitz, M. Biodiesel from Microalgae Lipids: From Inorganic Carbon to Energy Production. *Biofuels* **2018**, *9*, 175–202, doi:10.1080/17597269.2017.1289667.
324. Soliman, R.M.; Younis, S.A.; El-Gendy, N.S.; Mostafa, S.S.M.; El-Temtamy, S.A.; Hashim, A.I. Batch Bioethanol Production via the Biological and Chemical Saccharification of Some Egyptian Marine Macroalgae. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 422–440, doi:10.1111/jam.13886.
325. Amin, S. Review on Biofuel Oil and Gas Production Processes from Microalgae. *Energy Convers. Manag.* **2009**, *50*, 1834–1840, doi:10.1016/j.enconman.2009.03.001.
326. Alam, M.A.; Wang, Z. *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*; Springer Nature Singapore, 2019; ISBN 9789811322648.
327. Hossain, S.M.Z. Biochemical Conversion of Microalgae Biomass into Biofuel. *Chem. Eng. Technol.* **2019**, *42*, 2594–2607, doi:10.1002/ceat.201800605.
328. Brown, T.M.; Duan, P.; Savage, P.E. Hydrothermal Liquefaction and Gasification of *Nannochloropsis* Sp. *Energy and Fuels* **2010**, *24*, 3639–3646, doi:10.1021/ef100203u.
329. Elliott, D.C.; Biller, P.; Ross, A.B.; Schmidt, A.J.; Jones, S.B. Hydrothermal Liquefaction of Biomass: Developments from Batch to Continuous Process. *Bioresour. Technol.* **2015**, *178*, 147–156, doi:10.1016/j.biortech.2014.09.132.
330. Xu, D.; Wang, Y.; Lin, G.; Guo, S.; Wang, S.; Wu, Z. Co-Hydrothermal Liquefaction of Microalgae and Sewage Sludge in Subcritical Water: Ash Effects on Bio-Oil Production. *Renew. Energy* **2019**, *138*, 1143–1151, doi:10.1016/j.renene.2019.02.020.
331. Sharma, K.; Shah, A.A.; Toor, S.S.; Seehar, T.H.; Pedersen, T.H.; Rosendahl, L.A. Co-

BIBLIOGRAFÍA

- Hydrothermal Liquefaction of Lignocellulosic Biomass in Supercritical Water. *Energies* **2021**, *14*, 1708, doi:10.3390/en14061708.
332. Parsa, M.; Jalilzadeh, H.; Pazoki, M.; Ghasemzadeh, R.; Abdul, M.A. Hydrothermal Liquefaction of *Gracilaria Gracilis* and *Cladophora Glomerata* Macro-Algae for Biocrude Production. *Bioresour. Technol.* **2018**, *250*, 26–34, doi:10.1016/j.biortech.2017.10.059.
333. Biller, P.; Ross, A.B. Potential Yields and Properties of Oil from the Hydrothermal Liquefaction of Microalgae with Different Biochemical Content. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 215–225, doi:10.1016/j.biortech.2010.06.028.
334. Vardon, D.R.; Sharma, B.K.; Scott, J.; Yu, G.; Wang, Z.; Schideman, L.; Zhang, Y.; Strathmann, T.J. Chemical Properties of Biocrude Oil from the Hydrothermal Liquefaction of *Spirulina* Algae, Swine Manure, and Digested Anaerobic Sludge. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 8295–8303, doi:10.1016/j.biortech.2011.06.041.
335. Ross, A.B.; Biller, P.; Kubacki, M.L.; Li, H.; Lea-Langton, A.; Jones, J.M. Hydrothermal Processing of Microalgae Using Alkali and Organic Acids. *Fuel* **2010**, *89*, 2234–2243, doi:10.1016/j.fuel.2010.01.025.
336. Costa, P.A.; Mata, R.M.; Pinto, M.F.; Paradela, F.; Dutra, F. Hydrothermal Liquefaction of Microalgae for the Production of Biocrude and Value-Added Chemicals. *Chem. Eng. Trans.* **2022**, *94*, 865–870, doi:10.3303/CET2294144.
337. Haider, M.S.; Castello, D.; Michalski, K.M.; Pedersen, T.H.; Rosendahl, L.A. Catalytic Hydrotreatment of Microalgae Biocrude from Continuous Hydrothermal Liquefaction: Heteroatom Removal and Their Distribution in Distillation Cuts. *Energies* **2018**, *11*, 3360, doi:10.3390/en11123360.
338. Beims, R.F.; Hu, Y.; Shui, H.; Xu, C. Hydrothermal Liquefaction of Biomass to Fuels and Value-Added Chemicals: Products Applications and Challenges to Develop Large-Scale Operations. *Biomass and Bioenergy* **2020**, *135*, 105510, doi:10.1016/j.biombioe.2020.105510.
339. Swetha, A.; ShriVigneshwar, S.; Gopinath, K.P.; Sivaramakrishnan, R.; Shanmuganathan, R.; Arun, J. Review on Hydrothermal Liquefaction Aqueous Phase as a Valuable Resource for Biofuels, Bio-Hydrogen and Valuable Bio-Chemicals Recovery. *Chemosphere* **2021**, *283*, 131248, doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131248.
340. Jena, U.; Das, K.C.; Kastner, J.R. Effect of Operating Conditions of Thermochemical Liquefaction on Biocrude Production from *Spirulina Platensis*. *Bioresour. Technol.* **2011**,

-
- 102, 6221–6229, doi:10.1016/j.biortech.2011.02.057.
341. Gai, C.; Zhang, Y.; Chen, W.T.; Zhang, P.; Dong, Y. An Investigation of Reaction Pathways of Hydrothermal Liquefaction Using *Chlorella Pyrenoidosa* and *Spirulina Platensis*. *Energy Convers. Manag.* **2015**, *96*, 330–339, doi:10.1016/j.enconman.2015.02.056.
342. Ravichandran, S.R.; Venkatachalam, C.D.; Sengottian, M.; Sekar, S.; Kandasamy, S.; Ramasamy Subramanian, K.P.; Purushothaman, K.; Lavanya Chandrasekaran, A.; Narayanan, M. A Review on Hydrothermal Liquefaction of Algal Biomass on Process Parameters, Purification and Applications. *Fuel* **2022**, *313*, 122679, doi:10.1016/j.fuel.2021.122679.
343. Yu, G.; Zhang, Y.; Schideman, L.; Funk, T.L.; Wang, Z. Hydrothermal Liquefaction of Low Lipid Content Microalgae into Bio-Crude Oil. *Am. Soc. Agric. Biol. Eng.* **2011**, *54*, 239–246, doi:10.13031/2013.36241.
344. Vlaskin, M.S.; Chernova, N.I.; Kiseleva, S. V.; Popel', O.S.; Zhuk, A.Z. Hydrothermal Liquefaction of Microalgae to Produce Biofuels: State of the Art and Future Prospects. *Therm. Eng.* **2017**, *64*, 627–636, doi:10.1134/S0040601517090105.
345. Zou, S.; Wu, Y.; Yang, M.; Li, C.; Tong, J. Bio-Oil Production from Sub- and Supercritical Water Liquefaction of Microalgae *Dunaliella Tertiolecta* and Related Properties. *Energy Environ. Sci.* **2010**, *3*, 1073–1078, doi:10.1039/c002550j.
346. Cui, Z.; Cheng, F.; Jarvis, J.M.; Brewer, C.E.; Jena, U. Roles of Co-Solvents in Hydrothermal Liquefaction of Low-Lipid, High-Protein Algae. *Bioresour. Technol.* **2020**, *310*, 123454, doi:10.1016/j.biortech.2020.123454.
347. Singh, R.; Bhaskar, T.; Balagurumurthy, B. Effect of Solvent on the Hydrothermal Liquefaction of Macro Algae *Ulva Fasciata*. *Process Saf. Environ. Prot.* **2015**, *93*, 154–160, doi:10.1016/j.psep.2014.03.002.
348. Parimi, N.S.; Singh, M.; Kastner, J.R.; Das, K.C. Biomethane and Biocrude Oil Production from Protein Extracted Residual *Spirulina Platensis*. *Energy* **2015**, *93*, 697–704, doi:10.1016/j.energy.2015.09.041.
349. Han, Y.; Hoekman, K.; Jena, U.; Das, P. Use of Co-Solvents in Hydrothermal Liquefaction (HTL) of Microalgae. *Energies* **2020**, *13*, 124, doi:10.3390/en13010124.
350. Han, Y.; Hoekman, S.K.; Cui, Z.; Jena, U.; Das, P. Hydrothermal Liquefaction of Marine Microalgae Biomass Using Co-Solvents. *Algal Res.* **2019**, *38*, 101421, doi:10.1016/j.algal.2019.101421.

BIBLIOGRAFÍA

351. Biswas, B.; Arun Kumar, A.; Bisht, Y.; Singh, R.; Kumar, J.; Bhaskar, T. Effects of Temperature and Solvent on Hydrothermal Liquefaction of *Sargassum Tenerrimum* Algae. *Bioresour. Technol.* **2017**, *242*, 344–350, doi:10.1016/j.biortech.2017.03.045.
352. Cui, Z.; Cheng, F.; Jarvis, J.M.; Brewer, C.E.; Jena, U. Roles of Co-Solvents in Hydrothermal Liquefaction of Low-Lipid, High-Protein Algae. *Bioresour. Technol.* **2020**, *310*, 123454, doi:10.1016/j.biortech.2020.123454.
353. Wagner, J.L.; Perin, J.; Coelho, R.S.; Ting, V.P.; Chuck, C.J.; Teixeira Franco, T. Hydrothermal Conversion of Lipid-Extracted Microalgae Hydrolysate in the Presence of Isopropanol and Steel Furnace Residues. *Waste and Biomass Valorization* **2018**, *9*, 1867–1879, doi:10.1007/s12649-017-9944-7.
354. Masoumi, S.; Boahene, P.E.; Dalai, A.K. Biocrude Oil and Hydrochar Production and Characterization Obtained from Hydrothermal Liquefaction of Microalgae in Methanol-Water System. *Energy* **2021**, *217*, 119344, doi:10.1016/j.energy.2020.119344.
355. Jena, U.; Eboibi, B.E.; Das, K.C. Co-Solvent Assisted Hydrothermal Liquefaction of Algal Biomass and Biocrude Upgrading. *Fuels* **2022**, *3*, 326–341, doi:10.3390/fuels3020020.
356. Jena, U.; McCurdy, A.T.; Warren, A.; Summers, H.; Ledbetter, R.N.; Hoekman, S.K.; Seefeldt, L.C.; Quinn, J.C. Oleaginous Yeast Platform for Producing Biofuels via Co-Solvent Hydrothermal Liquefaction. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 1–19, doi:10.1186/s13068-015-0345-5.
357. Chynoweth, D.P.; Owens, J.M.; Legrand, R. Renewable Methane from Anaerobic Digestion of Biomass. *Renew. Energy* **2001**, *22*, 1–8, doi:10.1016/S0960-1481(00)00019-7.
358. Santos-Ballardo, D.U.; Rossi, S.; Reyes-Moreno, C.; Valdez-Ortiz, A. Microalgae Potential as a Biogas Source: Current Status, Restraints and Future Trends. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2016**, *15*, 243–264, doi:10.1007/s11157-016-9392-z.
359. Bauer, L.; Ranglová, K.; Masojídek, J.; Drogg, B.; Meixner, K. Digestate as Sustainable Nutrient Source for Microalgae—Challenges and Prospects. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1–21, doi:10.3390/app11031056.
360. Xia, A.; Murphy, J.D. Microalgal Cultivation in Treating Liquid Digestate from Biogas Systems. *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 264–275, doi:10.1016/j.tibtech.2015.12.010.
361. Vargas-Estrada, L.; Longoria, A.; Arenas, E.; Moreira, J.; Okoye, P.U.; Bustos-Terrones, Y.; Sebastian, P.J. A Review on Current Trends in Biogas Production from Microalgae Biomass and Microalgae Waste by Anaerobic Digestion and Co-Digestion. *Bioenergy*

BIBLIOGRAFÍA

- Res.* **2021**, *15*, 77–92, doi:10.1007/s12155-021-10276-2.
362. Abbasi, T.; Tauseef, S.M.; Abbasi, S.A. Biogas and Biogas Energy: An Introduction. In *Biogas Energy*; SpringerBriefs, Ed.; 2012; pp. 1–169 ISBN 9781461410409.
363. Raja, I.A.; Wazir, S. Biogas Production: The Fundamental Processes. *Univers. J. Eng. Sci.* **2017**, *5*, 29–37, doi:10.13189/ujes.2017.050202.
364. Zabed, H.M.; Akter, S.; Yun, J.; Zhang, G.; Zhang, Y.; Qi, X. Biogas from Microalgae: Technologies, Challenges and Opportunities. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2020**, *117*, 109503, doi:10.1016/j.rser.2019.109503.
365. Merlin Christy, P.; Gopinath, L.R.; Divya, D. A Review on Anaerobic Decomposition and Enhancement of Biogas Production through Enzymes and Microorganisms. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *34*, 167–173, doi:10.1016/j.rser.2014.03.010.
366. Alzate, M.E.; Muñoz, R.; Rogalla, F.; Fdz-Polanco, F.; Pérez-Elvira, S.I. Biochemical Methane Potential of Microalgae: Influence of Substrate to Inoculum Ratio, Biomass Concentration and Pretreatment. *Bioresour. Technol.* **2012**, *123*, 488–494, doi:10.1016/j.biortech.2012.06.113.
367. Solé-Bundó, M.; Passos, F.; Romero-Güiza, M.S.; Ferrer, I.; Astals, S. Co-Digestion Strategies to Enhance Microalgae Anaerobic Digestion: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2019**, *112*, 471–482, doi:10.1016/j.rser.2019.05.036.
368. Parimi, N.S.; Singh, M.; Kastner, J.R.; Das, K.C. Biomethane and Biocrude Oil Production from Protein Extracted Residual *Spirulina Platensis*. *Energy* **2015**, *93*, 697–704, doi:10.1016/j.energy.2015.09.041.
369. Carotenuto, C.; Guarino, G.; D'Amelia, L.I.; Morrone, B.; Minale, M. The Peculiar Role of C/N and Initial PH in Anaerobic Digestion of Lactating and Non-Lactating Water Buffalo Manure. *Waste Manag.* **2020**, *103*, 12–21, doi:10.1016/j.wasman.2019.12.008.
370. Parkin, G.F.; Owen, W.F. Fundamentals of Anaerobic Digestion of Wastewater Sludges. *J. Environ. Eng.* **1986**, *112*, 867–920, doi:10.1061/(asce)0733-9372(1986)112:5(867).
371. Mara, D.; Horan, N. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*; Elsevier Ltd, 2003; ISBN 9780080478197.
372. Uggetti, E.; Passos, F.; Solé, M.; Garfí, M.; Ferrer, I. Recent Achievements in the Production of Biogas from Microalgae. *Waste and Biomass Valorization* **2017**, *8*, 129–139, doi:10.1007/s12649-016-9604-3.
373. Kwietniewska, E.; Tys, J. Process Characteristics, Inhibition Factors and Methane Yields

- of Anaerobic Digestion Process, with Particular Focus on Microalgal Biomass Fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *34*, 491–500, doi:10.1016/j.rser.2014.03.041.
374. Ramos-Suárez, J.L.; Carreras, N. Use of Microalgae Residues for Biogas Production. *Chem. Eng. J.* **2014**, *242*, 86–95, doi:10.1016/j.cej.2013.12.053.
375. Alzate, M.E.; Muñoz, R.; Rogalla, F.; Fdz-Polanco, F.; Pérez-Elvira, S.I. Biochemical Methane Potential of Microalgae Biomass after Lipid Extraction. *Chem. Eng. J.* **2014**, *243*, 405–410, doi:10.1016/j.cej.2013.07.076.
376. Jankowska, E.; Sahu, A.K.; Oleskowicz-Popiel, P. Biogas from Microalgae: Review on Microalgae's Cultivation, Harvesting and Pretreatment for Anaerobic Digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *75*, 692–709, doi:10.1016/j.rser.2016.11.045.
377. González-Fernández, C.; Molinuevo-Salces, B.; García-González, M.C. Evaluation of Anaerobic Codigestion of Microalgal Biomass and Swine Manure via Response Surface Methodology. *Appl. Energy* **2011**, *88*, 3448–3453, doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.035.
378. Yuan, X.; Wang, M.; Park, C.; Sahu, A.K.; Ergas, S.J. Microalgae Growth Using High-Strength Wastewater Followed by Anaerobic Co-Digestion. *Water Environ. Res.* **2012**, *84*, 396–404, doi:10.2175/106143011x13233670703242.
379. Ehimen, E.A.; Sun, Z.F.; Carrington, C.G.; Birch, E.J.; Eaton-Rye, J.J. Anaerobic Digestion of Microalgae Residues Resulting from the Biodiesel Production Process. *Appl. Energy* **2011**, *88*, 3454–3463, doi:10.1016/j.apenergy.2010.10.020.
380. Eppink, M.H.M.; Ventura, S.P.M.; Coutinho, J.A.P.; Wijffels, R.H. Multiproduct Microalgae Biorefineries Mediated by Ionic Liquids. *Trends Biotechnol.* **2021**, *39*, 1131–1143, doi:10.1016/j.tibtech.2021.02.009.
381. Gnansounou, E.; Pandey, A. Classification of Biorefineries Taking into Account Sustainability Potentials and Flexibility. In *Life-Cycle Assessment of Biorefineries*; Elsevier B.V., 2017; pp. 1–39 ISBN 978-0-444-63585-3.
382. Vernès, L.; Li, Y.; Chemat, F.; Abert-Vian, M. Biorefinery Concept as a Key for Sustainable Future to Green Chemistry—The Case of Microalgae. In *Plant Based “Green Chemistry 2.0”*; Springer Singapore, 2019; pp. 15–50 ISBN 9789811338106.
383. Manirafasha, E.; Jiao, K.; Zeng, X.; Xu, Y.; Tang, X.; Sun, Y.; Lin, L.; Murwanashyaka, T.; Ndikubwimana, T.; Jing, K.; et al. Processing of Microalgae to Biofuels. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*; Elsevier Inc., 2020; pp. 111–128 ISBN 9780128175361.

BIBLIOGRAFÍA

384. de Jong, E.; Jungmeier, G. Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries. In *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*; Elsevier B.V., 2015; pp. 3–33 ISBN 9780444634535.
385. Arashiro, L.T.; Ferrer, I.; Pániker, C.C.; Gómez-Pinchetti, J.L.; Rousseau, D.P.L.; Van Hulle, S.W.H.; Garfí, M. Natural Pigments and Biogas Recovery from Microalgae Grown in Wastewater. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 10691–10701, doi:10.1021/acssuschemeng.0c01106.
386. Hunt, R.G.; Sellers, J.D.; Franklin, W.E. Resource and Environmental Profile Analysis: A Life Cycle Environmental Assessment for Products and Procedures. *Environ. Impact Assess. Rev.* **1992**, *12*, 245–269, doi:10.1016/0195-9255(92)90020-X.
387. González-Delgado, A. D. & Kafarov, V. Microalgae Based Biorefinery: Issues to Consider. *CT&F - Ciencia, Tecnol. y Futur.* **2011**, *4*, 5–22, doi:10.29047/01225383.225.
388. Danquah, M.K.; Ang, L.; Uduman, N.; Moheimani, N.; Forde, G.M. Dewatering of Microalgal Culture for Biodiesel Production: Exploring Polymer Flocculation and Tangential Flow Filtration. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 1078–1083, doi:10.1002/jctb.2137.
389. Préat, N.; Taelman, S.E.; De Meester, S.; Allais, F.; Dewulf, J. Identification of Microalgae Biorefinery Scenarios and Development of Mass and Energy Balance Flowsheets. *Algal Res.* **2020**, *45*, 101737, doi:10.1016/j.algal.2019.101737.
390. Assunção, J.; Amaro, H.M.; Malcata, F.X.; Guedes, A.C. Factorial Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phycocyanin from *Synechocystis Salina*: Towards a Biorefinery Approach. *Life* **2022**, *12*, 1389, doi:10.3390/life12091389.
391. Chen, P.H.; Quinn, J.C. Microalgae to Biofuels through Hydrothermal Liquefaction: Open-Source Techno-Economic Analysis and Life Cycle Assessment. *Appl. Energy* **2021**, *289*, 116613, doi:10.1016/j.apenergy.2021.116613.
392. Rito-Palomares, M.; Nuez, L.; Amador, D. Practical Application of Aqueous Two-Phase Systems for the Development of a Prototype Process for c-Phycocyanin Recovery from *Spirulina Maxima*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2001**, *76*, 1273–1280, doi:10.1002/jctb.507.
393. Julianti, E.; Susanti; Singgih, M.; Neti Mulyani, L. Optimization of Extraction Method and Characterization of Phycocyanin Pigment from *Spirulina Platensis*. *J. Math. Fundam. Sci.* **2019**, *51*, 168–176, doi:10.5614/j.math.fund.sci.2019.51.2.6.
394. Ferreira, A.M.; Coutinho, J.A.P.; Fernandes, A.M.; Freire, M.G. Complete Removal of

- Textile Dyes from Aqueous Media Using Ionic-Liquid-Based Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, *128*, 58–66, doi:10.1016/j.seppur.2014.02.036.
395. Wang, W.; Zhang, X.; Xu, C.; Cheng, H. Purification and Concentration of C-Phycocyanin from *Spirulina Platensis* Using Aqueous Two-Phase System. *Appl. Mech. Mater.* **2012**, *138–139*, 995–1001, doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.138-139.995.
396. Zhang, X.; Zhang, F.; Luo, G.; Yang, S.; Wang, D. Extraction and Separation of Phycocyanin from *Spirulina* Using Aqueous Two-Phase Systems of Ionic Liquid and Salt. *J. Food Nutr. Res.* **2015**, *3*, 15–19, doi:10.12691/jfnr-3-1-3.
397. Lin, X.; Wang, Y.; Zeng, Q.; Ding, X.; Chen, J. Extraction and Separation of Proteins by Ionic Liquid Aqueous Two-Phase System. *Analyst* **2013**, *138*, 6445–6453, doi:10.1039/c3an01301d.
398. Rezende, R.; Mendonça, D.; Kunigami, C.N.; Gomes, D.A.; Lapa, C.M.L. Comparison between Several Methods of Total Lipid Extraction from *Chlorella Vulgaris* Biomass. *Ultrason. Sonochem.* **2015**, *22*, 95–99, doi:10.1016/j.ultsonch.2014.05.015.
399. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A Rapid Method of Total Extration and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917, doi:10.1139/o59-099.
400. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Lewis Farr, A.; Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Anal. Biochem.* **1951**, *193*, 265–275, doi:10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
401. Dubois, M.; Gilles, K. a.; Hamilton, J.K.; Rebers, P. a.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356, doi:10.1021/ac60111a017.
402. Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426–428, doi:10.1021/ac60147a030.
403. Miller, G.L.; Slater, R.; Birzgalis, R.; Blum, R. Application of Different Colorimetric Tests to Cellodextrins. *Anal. Biochem.* **1961**, *2*, 521–528, doi:10.1016/0003-2697(61)90019-7.
404. Bennett, A.; Bogobad, L. Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green Alga. *J. Cell Biol.* **1973**, *58*, 419–435, doi:10.1083/jcb.58.2.419.
405. Abalde, J.; Betancourt, L.; Torres, E.; Cid, A.; Barwell, C. Purification and Characterization of Phycocyanin from the Marine Cyanobacterium *Synechococcus* Sp. IO9201. *Plant Sci.* **1998**, *136*, 109–120, doi:10.1016/S0168-9452(98)00113-7.

BIBLIOGRAFÍA

406. López Barreiro, D.; Samorì, C.; Terranella, G.; Hornung, U.; Kruse, A.; Prins, W. Assessing Microalgae Biorefinery Routes for the Production of Biofuels via Hydrothermal Liquefaction. *Bioresour. Technol.* **2014**, *174*, 256–265, doi:10.1016/j.biortech.2014.10.031.
407. Cárdenas, L.M.; Parra, B.A.; Torres, P.; Vásquez, C.H. Perspectivas Del Ensayo de Potencial Bioquímico de Metano - PBM Para El Control Del Proceso de Digestión Anaerobia de Residuos. *Rev. ION* **2016**, *29*, 95–108.
408. Kasani, A.A.; Esmaeili, A.; Golzary, A. Software Tools for Microalgae Biorefineries: Cultivation, Separation, Conversion Process Integration, Modeling, and Optimization. *Algal Res.* **2022**, *61*, 102597, doi:10.1016/j.algal.2021.102597.
409. Restrepo-Serna, D.L.; Martínez-Ruano, J.A.; Cardona-Alzate, C.A. Energy Efficiency of Biorefinery Schemes Using Sugarcane Bagasse as Raw Material. *Energies* **2018**, *11*, 3474, doi:10.3390/en11123474.
410. Rodríguez, R.; Espada, J.J.; Moreno, J.; Vicente, G.; Bautista, L.F.; Morales, V.; Sánchez-Bayo, A.; Dufour, J. Environmental Analysis of *Spirulina* Cultivation and Biogas Production Using Experimental and Simulation Approach. *Renew. Energy* **2018**, *129*, 724–732, doi:10.1016/j.renene.2017.05.076.
411. Kumar, D.; Singh, V.; Guest, J.S. BioSTEAM: A Fast and Flexible Platform for the Design, Simulation, and Techno-Economic Analysis of Biorefineries under Uncertainty. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 3302–3310, doi:10.1021/acssuschemeng.9b07040.
412. Rehling, B.; Hofbauer, H.; Rauch, R.; Aichernig, C. BioSNG - Process Simulation and Comparison with First Results from a 1-MW Demonstration Plant. *Biomass Conv. Bioref.* **2011**, *1*, 111–119, doi:10.1007/s13399-011-0013-3.
413. British Standard: International Standards Organization ISO 14040:2006 Environmental Management - Life Cycle Assessment - Principles and Framework. **2006**, *3*.
414. Zakrzewska, M.E.; Bogel-Yukasik, E.; Bogel-Yukasik, R. Solubility of Carbohydrates in Ionic Liquids. *Energy and Fuels* **2010**, *24*, 737–745, doi:10.1021/ef901215m.
415. Orr, V.C.A.; Plechkova, N. V.; Seddon, K.R.; Rehmman, L. Disruption and Wet Extraction of the Microalgae *Chlorella Vulgaris* Using Room-Temperature Ionic Liquids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 591–600, doi:10.1021/acssuschemeng.5b00967.
416. Kim, Y.H.; Park, S.; Kim, M.H.; Choi, Y.K.; Yang, Y.H.; Kim, H.J.; Kim, H.; Kim, H.S.; Song, K.G.; Lee, S.H. Ultrasound-Assisted Extraction of Lipids from *Chlorella Vulgaris* Using [Bmim][MeSO₄]. *Biomass and Bioenergy* **2013**, *56*, 99–103,

- doi:10.1016/j.biombioe.2013.04.022.
417. Rajkumar, T.; Ranga Rao, G. Synthesis and Characterization of Hybrid Molecular Material Prepared by Ionic Liquid and Silicotungstic Acid. *Mater. Chem. Phys.* **2008**, *112*, 853–857, doi:10.1016/j.matchemphys.2008.06.046.
418. Chen, H.; Qi, H.; Xiong, P. Phycobiliproteins—A Family of Algae-Derived Biliproteins: Productions, Characterization and Pharmaceutical Potentials. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 450, doi:10.3390/md20070450.
419. Hardman, S.J.O.; Hauck, A.F.E.; Clark, I.P.; Heyes, D.J.; Scrutton, N.S. Comprehensive Analysis of the Green-to-Blue Photoconversion of Full-Length Cyanobacteriochrome Tlr0924. *Biophys. J.* **2014**, *107*, 2195–2203, doi:10.1016/j.bpj.2014.09.020.
420. Silva, M.; Figueiredo, A.M.; Cabrita, E.J. Epitope Mapping of Imidazolium Cations in Ionic Liquid-Protein Interactions Unveils the Balance between Hydrophobicity and Electrostatics towards Protein Destabilisation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 23394–23403, doi:10.1039/c4cp03534h.
421. Eisenberg, D.; Schwarz, E.; Komaromy, M.; Wall, R. Analysis of Membrane and Surface Protein Sequences with the Hydrophobic Moment Plot. *J. Mol. Biol.* **1984**, *179*, 125–142, doi:10.1016/0022-2836(84)90309-7.
422. Mohamed, S.A.; Osman, A.; Eita, A.A.; Sitohy, M.Z. Estimation of Antibacterial and Antioxidant Activities of Phycocyanin Isolated from *Spirulina*. *Zagazig J. Agric. Res.* **2018**, *45*, 657–666, doi:10.21608/zjar.2018.49187.
423. Falkeborg, M.F.; Roda-Serrat, M.C.; Burnæs, K.L.; Nielsen, A.L.D. Stabilising Phycocyanin by Anionic Micelles. *Food Chem.* **2018**, *239*, 771–780, doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.007.
424. Moraes, C.C.; Kalil, S.J. Strategy for a Protein Purification Design Using C-Phycocyanin Extract. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 5312–5317, doi:10.1016/j.biortech.2009.05.026.
425. Patel, A.; Mishra, S.; Pawar, R.; Ghosh, P.K. Purification and Characterization of C-Phycocyanin from Cyanobacterial Species of Marine and Freshwater Habitat. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *40*, 248–255, doi:10.1016/j.pep.2004.10.028.
426. Kumar, D.; Dhar, D.W.; Pabbi, S.; Kumar, N.; Walia, S. Extraction and Purification of C-Phycocyanin from *Spirulina Platensis* (CCC540). *Indian J. Plant Physiol.* **2014**, *19*, 184–188, doi:10.1007/s40502-014-0094-7.
427. Karthick Raja Namasivayam, S.; Shivaramkrishnan, K.; Arvind Bharani, R.S. Potential

BIBLIOGRAFÍA

- Antioxidative Protein-Pigment Complex *Spirulina Platensis* Mediated Food Grade Phycocyanin C-Extraction, Purification, Antioxidative Activity and Biocompatibility. *Indian J. Biochem. Biophys.* **2019**, *56*, 230–239.
428. Campos Assumpção de Amarante, M.; Cavalcante Braga, A.R.; Sala, L.; Costa Moraes, C.; Kalil, S.J. Design Strategies for C-Phycocyanin Purification: Process Influence on Purity Grade. *Sep. Purif. Technol.* **2020**, *252*, 117453, doi:10.1016/j.seppur.2020.117453.
429. Suarez Ruiz, C.A.; Cabau-Peinado, O.; Van Den Berg, C.; Wijffels, R.H.; Eppink, M.H.M. Efficient Fractionation of Lipids in a Multiproduct Microalgal Biorefinery by Polymers and Ionic Liquid-Based Aqueous Two-Phase Systems. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2022**, *10*, 789–799, doi:10.1021/acssuschemeng.1c06017.
430. Andrews, B.A.; Schmidt, A.S.; Asenjo, J.A. Correlation for the Partition Behavior of Proteins in Aqueous Two-Phase Systems: Effect of Surface Hydrophobicity and Charge. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *90*, 380–390, doi:10.1002/bit.20495.
431. Murray Moo-Young, Michael Butler, Colin Webb, Antonio Moreira, Bernard Grodzinski, Z.F.C. *Comprehensive Biotechnology*; Third edit.; Elsevier B.V., 2019; ISBN 9780444640468.
432. Suarez Garcia, E.; Suarez Ruiz, C.A.; Tilaye, T.; Eppink, M.H.M.; Wijffels, R.H.; van den Berg, C. Fractionation of Proteins and Carbohydrates from Crude Microalgae Extracts Using an Ionic Liquid Based-Aqueous Two Phase System. *Sep. Purif. Technol.* **2018**, *204*, 56–65, doi:10.1016/j.seppur.2018.04.043.
433. Piron, R.; Bustamante, T.; Barriga, A.; Lagos, N. Phycobilisome Isolation and C-Phycocyanin Purification from the Cyanobacterium *Aphanizomenon Gracile*. *Photosynthetica* **2019**, *57*, 491–499, doi:10.32615/ps.2019.064.
434. Kaur, S.; Khattar, J.I.S.; Singh, Y.; Singh, D.P.; Ahluwalia, A.S. Extraction, Purification and Characterisation of Phycocyanin from *Anabaena Fertilissima* PUPCCC 410.5: As a Natural and Food Grade Stable Pigment. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 1685–1696, doi:10.1007/s10811-018-1722-9.
435. Shang, M.H.; Sun, J.F.; Bi, Y.; Xu, X.T.; Zang, X.N. Fluorescence and Antioxidant Activity of Heterologous Expression of Phycocyanin and Allophycocyanin from *Arthrospira Platensis*. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1127422, doi:10.3389/fnut.2023.1127422.
436. Berta Gutiérrez-Cirlos, E.; Pérez-Gómez, B.; Krogmann, D.W.; Gómez-Lojero, C. The Phycocyanin-Associated Rod Linker Proteins of the Phycobilisome of *Gloeobacter Violaceus* PCC 7421 Contain Unusually Located Rod-Capping Domains. *Biochim.*

- Biophys. Acta - Bioenerg.* **2006**, *1757*, 130–134, doi:10.1016/j.bbabi.2006.01.006.
437. Hazra, P.; Saha Kesh, G. Isolation and Purification of Phycocyanin from Cyanobacteria of a Mangrove Forest. *Appl. Biol. Chem.* **2017**, *60*, 631–636, doi:10.1007/s13765-017-0320-x.
438. Villaver, W.S.; Carpio, R.B.; Yap, K.J.; De Leon, R.L. Effects of Temperature and Reaction Time on Yield and Properties of Biocrude Oil Produced by Hydrothermal Liquefaction of *Spirulina Platensis*. *Int. J. Smart Grid Clean Energy* **2018**, *7*, 32–41, doi:10.12720/sgce.7.1.32-41.
439. Toor, S.S.; Reddy, H.; Deng, S.; Hoffmann, J.; Spangsmark, D.; Madsen, L.B.; Holm-Nielsen, J.B.; Rosendahl, L.A. Hydrothermal Liquefaction of *Spirulina* and *Nannochloropsis Salina* under Subcritical and Supercritical Water Conditions. *Bioresour. Technol.* **2013**, *131*, 413–419, doi:10.1016/j.biortech.2012.12.144.
440. Palomino, A.; Godoy-Silva, R.D.; Raikova, S.; Chuck, C.J. The Storage Stability of Biocrude Obtained by the Hydrothermal Liquefaction of Microalgae. *Renew. Energy* **2020**, *145*, 1720–1729, doi:10.1016/j.renene.2019.07.084.
441. Biller, P.; Ross, A.B. Potential Yields and Properties of Oil from the Hydrothermal Liquefaction of Microalgae with Different Biochemical Content. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 215–225, doi:10.1016/j.biortech.2010.06.028.
442. Luo, L.; Sheehan, J.D.; Dai, L.; Savage, P.E. Products and Kinetics for Isothermal Hydrothermal Liquefaction of Soy Protein Concentrate. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 2725–2733, doi:10.1021/acssuschemeng.6b00226.
443. Gai, C.; Zhang, Y.; Chen, W.T.; Zhang, P.; Dong, Y. An Investigation of Reaction Pathways of Hydrothermal Liquefaction Using *Chlorella Pyrenoidosa* and *Spirulina Platensis*. *Energy Convers. Manag.* **2015**, *96*, 330–339, doi:10.1016/j.enconman.2015.02.056.
444. Xu, D.; Savage, P.E. Effect of Temperature, Water Loading, and Ru/C Catalyst on Water-Insoluble and Water-Soluble Biocrude Fractions from Hydrothermal Liquefaction of Algae. *Bioresour. Technol.* **2017**, *239*, 1–6, doi:10.1016/j.biortech.2017.04.127.
445. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917, doi:10.1139/o59-099.
446. Akhtar, J.; Amin, N.A.S. A Review on Process Conditions for Optimum Bio-Oil Yield in Hydrothermal Liquefaction of Biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2011**, *15*, 1615–1624, doi:10.1016/j.rser.2010.11.054.

BIBLIOGRAFÍA

447. Toor, S.S.; Rosendahl, L.; Rudolf, A. Hydrothermal Liquefaction of Biomass: A Review of Subcritical Water Technologies. *Energy* **2011**, *36*, 2328–2342, doi:10.1016/j.energy.2011.03.013.
448. Han, Y.; Hoekman, K.; Jena, U.; Das, P. Use of Co-Solvents in Hydrothermal Liquefaction (HTL) of Microalgae. *Energies* **2020**, *13*, 124, doi:10.3390/en13010124.
449. Costanzo, W.; Hilten, R.; Jena, U.; Das, K.C.; Kastner, J.R. Effect of Low Temperature Hydrothermal Liquefaction on Catalytic Hydrodenitrogenation of Algae Biocrude and Model Macromolecules. *Algal Res.* **2016**, *13*, 53–68, doi:10.1016/j.algal.2015.11.009.
450. Liu, T.; Yang, L.; Jiao, H.; Jin, Z.; Chen, P.; Leng, S.; Zhou, W. Fractional Distillation of Biocrude from Hydrothermal Liquefaction of Microalgae: Upgrading of Fuel Properties. *Algal Res.* **2022**, *68*, 102888, doi:10.1016/j.algal.2022.102888.
451. Ghadge, R.; Nagwani, N.; Saxena, N.; Dasgupta, S.; Sapre, A. Design and Scale-up Challenges in Hydrothermal Liquefaction Process for Biocrude Production and Its Upgradation. *Energy Convers. Manag. X.* **2022**, *14*, 100223, doi:10.1016/j.ecmx.2022.100223.
452. Gollakota, A.R.K.; Kishore, N.; Gu, S. A Review on Hydrothermal Liquefaction of Biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *81*, 1378–1392, doi:10.1016/j.rser.2017.05.178.
453. Zhang, B.; Chen, J.; Kandasamy, S.; He, Z. Hydrothermal Liquefaction of Fresh Lemon-Peel and *Spirulina Platensis* Blending -Operation Parameter and Biocrude Chemistry Investigation. *Energy* **2020**, *193*, 116645, doi:10.1016/j.energy.2019.116645.
454. Zheng, Y.; Zhang, B. Hydrothermal Liquefaction of *Spirulina Platensis* in Post-Carbonization Wastewater from Sewage Sludge. *Inorg. Chem. Commun.* **2021**, *134*, 108963, doi:10.1016/j.inoche.2021.108963.
455. Huang, Y.; Chen, Y.; Xie, J.; Liu, H.; Yin, X.; Wu, C. Bio-Oil Production from Hydrothermal Liquefaction of High-Protein High-Ash Microalgae Including Wild Cyanobacteria Sp. and Cultivated *Bacillariophyta* Sp. *Fuel* **2016**, *183*, 9–19, doi:10.1016/j.fuel.2016.06.013.
456. Xu, D.; Lin, G.; Guo, S.; Wang, S.; Guo, Y.; Jing, Z. Catalytic Hydrothermal Liquefaction of Algae and Upgrading of Biocrude: A Critical Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *97*, 103–118, doi:10.1016/j.rser.2018.08.042.
457. Abdel Kader, E.; Abo El -Enin, S.; El-Ibiari, N.; El-Diwani, G.; Hawash, S. Hydrothermal Liquefaction of Microalgae (*Spirulina Platensis*) under Subcritical Water Conditions for

- Bio-Fuel Production. *Int. J. Eng. Innov. Technol.* **2015**, *5*, 48–56, doi:10.17605/OSF.IO/S8FRV.
458. Christensen, P.S.; Peng, G.; Vogel, F.; Iversen, B.B. Hydrothermal Liquefaction of the Microalgae *Phaeodactylum Tricornutum*: Impact of Reaction Conditions on Product and Elemental Distribution. *Energy and Fuels* **2014**, *28*, 5792–5803, doi:10.1021/ef5012808.
459. Garcia Alba, L.; Torri, C.; Fabbri, D.; Kersten, S.R.A.; Wim Brilman, D.W.F. Microalgae Growth on the Aqueous Phase from Hydrothermal Liquefaction of the Same Microalgae. *Chem. Eng. J.* **2013**, *228*, 214–223, doi:10.1016/j.cej.2013.04.097.
460. Megía-Hervás, I.; Sánchez-Bayo, A.; Bautista, L.F.; Morales, V.; Witt-Sousa, F.G.; Segura-Fornieles, M.; Vicente, G. Scale-up Cultivation of *Phaeodactylum Tricornutum* to Produce Biocrude by Hydrothermal Liquefaction. *Processes* **2020**, *8*, 1072, doi:10.3390/pr8091072.
461. Lu, J.; Zhang, Z.; Zhang, L.; Fan, G.; Wu, Y.; Yang, M. Catalytic Hydrothermal Liquefaction of Microalgae over Different Biochars. *Catal. Commun.* **2021**, *149*, 106236, doi:10.1016/j.catcom.2020.106236.
462. Watson, J.; Lu, J.; de Souza, R.; Si, B.; Zhang, Y.; Liu, Z. Effects of the Extraction Solvents in Hydrothermal Liquefaction Processes: Biocrude Oil Quality and Energy Conversion Efficiency. *Energy* **2019**, *167*, 189–197, doi:10.1016/j.energy.2018.11.003.
463. El-Mashad, H.M. Kinetics of Methane Production from the Codigestion of Switchgrass and *Spirulina Platensis* Algae. *Bioresour. Technol.* **2013**, *132*, 305–312, doi:10.1016/j.biortech.2012.12.183.
464. Mendoza, Á.; Morales, V.; Sánchez-Bayo, A.; Rodríguez-Escudero, R.; González-Fernández, C.; Bautista, L.F.; Vicente, G. The Effect of the Lipid Extraction Method Used in Biodiesel Production on the Integrated Recovery of Biodiesel and Biogas from *Nannochloropsis Gaditana*, *Isochrysis Galbana* and *Arthrospira Platensis*. *Biochem. Eng. J.* **2020**, *154*, 107428, doi:10.1016/j.bej.2019.107428.
465. González-Fernández, C.; Méndez, L.; Tomas-Pejó, E.; Ballesteros, M. Biogas and Volatile Fatty Acids Production: Temperature as a Determining Factor in the Anaerobic Digestion of *Spirulina Platensis*. *Waste and Biomass Valorization* **2019**, *10*, 2507–2515, doi:10.1007/s12649-018-0275-0.
466. Mao, C.; Feng, Y.; Wang, X.; Ren, G. Review on Research Achievements of Biogas from Anaerobic Digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *45*, 540–555, doi:10.1016/j.rser.2015.02.032.

BIBLIOGRAFÍA

467. González-González, L.M.; Correa, D.F.; Ryan, S.; Jensen, P.D.; Pratt, S.; Schenk, P.M. Integrated Biodiesel and Biogas Production from Microalgae: Towards a Sustainable Closed Loop through Nutrient Recycling. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *82*, 1137–1148, doi:10.1016/j.rser.2017.09.091.
468. Gonzalez-Fernandez, C.; Sialve, B.; Molinuevo-Salces, B. Anaerobic Digestion of Microalgal Biomass: Challenges, Opportunities and Research Needs. *Bioresour. Technol.* **2015**, *198*, 896–906, doi:10.1016/j.biortech.2015.09.095.
469. Caporgno, M.P.; Trobajo, R.; Caiola, N.; Ibáñez, C.; Fabregat, A.; Bengoa, C. Biogas Production from Sewage Sludge and Microalgae Co-Digestion under Mesophilic and Thermophilic Conditions. *Renew. Energy* **2015**, *75*, 374–380, doi:10.1016/j.renene.2014.10.019.
470. Conidi, C.; Cassano, A.; Drioli, E. Membrane Diafiltration for Enhanced Purification of Biologically Active Compounds from Goji Berries Extracts. *Sep. Purif. Technol.* **2022**, *282*, 119991, doi:10.1016/j.seppur.2021.119991.
471. Aitor, P., Rodriguez, C., Cirot, A. LCIA Methods: Impact Assessment Methods in Life Cycle Assessment and Their Impact Categories. *Green Delta* **2016**, 1–23.
472. Guinée, J.B.; Gorrée, M.; Heijungs, R.; Huppes, G.; Kleijn, R.; Koning, A. de; Oers, L. van; Wegener Sleeswijk, A.; Suh, S.; Udo de Haes, H.A.; Bruijn, H. de; Duin, R. van; Huijbregts, M.A.. *Handbook on Life Cycle Assessment*; Dr. Arnold Tukker, TNO Institute of Strategy, T. and P.E., Ed.; Springer Dordrecht, 2002; ISBN 0306480557.
473. Tang, J.; Cai, W.; Yan, Z.; Zhang, K.; Zhou, Z.; Zhao, J.; Lin, S. Interactive Effects of Acidification and Copper Exposure on the Reproduction and Metabolism of Coral Endosymbiont *Cladocodium Goreaui*. *Mar. Pollut. Bull.* **2022**, *177*, 113508, doi:10.1016/j.marpolbul.2022.113508.
474. Hischer, R.; Weidema, B.; Althaus, H.-J. *Implementation of Life Cycle Impact Assessment Methods*; Hischer, R., Weidema, B., Althaus, H.-J., Bauer, C., Doka, G., Dones, R., Frischknecht, R., Hellweg, S., Humbert, S., Jungbluth, N., Köllner, T., Loerincik, Y., Margni, M., Nemecek, T., Eds.; Swiss Centre for Life Cycle Inventories, 2010;
475. Sun, J.; Shi, J.; Konda, N.V.S.N.M.; Campos, D.; Liu, D.; Nemser, S.; Shamshina, J.; Dutta, T.; Berton, P.; Gurau, G.; et al. Biotechnology for Biofuels Efficient Dehydration and Recovery of Ionic Liquid after Lignocellulosic Processing Using Pervaporation. *Biotechnol. Biofuels* **2017**, 1–14, doi:10.1186/s13068-017-0842-9.

BIBLIOGRAFÍA
