



**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias



## **Trabajo Fin de Máster**

Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y Control de  
Calidad Químicos.

### **Influencia de fármacos veterinarios y metales pesados en la valorización de biomasa algal crecida en aguas residuales de purines**

**Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente**

***Autora: María Hurtado Gutiérrez***

***Tutoras: Silvia Bolado Rodríguez***

***Elena María Rojo de Benito***

*Septiembre del 2022*



# ÍNDICE

---

RESUMEN.....	4
ABSTRACT .....	5
LISTADO DE TABLAS.....	6
LISTADO DE FIGURAS.....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.1. Las microalgas.....	9
1.1.1 Antecedentes históricos de estudios con microalgas.....	10
1.1.2. Composición química de la biomasa algal.....	10
1.2. Utilización y aplicaciones de las microalgas .....	12
1.2.1. Mecanismos de tratamiento y biorremediación de aguas residuales con microalgas.....	12
1.2.2. Empleo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales de purín de cerdo .....	13
1.2.3. Problemática de los fármacos veterinarios .....	14
1.2.4. Problemática de los metales pesados .....	15
1.3. Valorización de las microalgas.....	16
1.3.1 Mecanismos de ruptura de la pared celular de la microalga .....	17
1.4. Justificación de los métodos de extracción escogidos .....	22
2. OBJETIVOS, PLAN DE TRABAJO Y JUSTIFICACIÓN .....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
3.1. Biomasa utilizada como materia prima .....	24
3.2. Métodos analíticos .....	24
3.2.1. Determinación de sólidos totales y sólidos volátiles.....	25
3.2.2. Determinación de lípidos.....	25
3.2.3. Determinación de proteínas.....	26
3.2.4. Determinación de carbohidratos.....	27
3.2.5. Determinación de metales .....	27
3.2.6. Determinación de carbono orgánico total (TOC).....	28
3.2.7. Cálculo de solubilización y recuperación.....	28
3.3. Experimentos realizados.....	29
3.3.1. UAE (Ultrasound Assisted Extraction).....	29
3.3.2. Hidrólisis enzimática .....	30
3.3.3. UAEE (Ultrasound Assisted Extraction + Enzima) .....	31
3.3.4. Hidrólisis química en medio básico .....	31
3.3.5. Hidrólisis química en medio ácido.....	32
3.4. Análisis estadístico.....	32

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
4.1. Influencia de los fármacos en la composición de la biomasa.....	33
4.2. Influencia de los metales en la composición de la biomasa .....	35
4.3. Influencia de los fármacos en la solubilización de proteínas y recuperación de péptidos.....	38
4.4. Influencia de los fármacos en la solubilización y recuperación de carbohidratos .....	40
4.5. Influencia de los metales en la solubilización de proteínas y la recuperación de péptidos.....	43
4.6. Influencia de los metales en la solubilización y recuperación de carbohidratos .....	46
4.6.1. Análisis del carbono orgánico total (TOC) .....	51
4.7. Distribución de los metales en las fases líquidas y sólidas .....	52
5. CONCLUSIONES.....	57
6. BIBLIOGRAFÍA .....	59

# RESUMEN

---

A lo largo de este trabajo se estudió la composición bioquímica de biomasa microalgal compuesta principalmente por la especie *Scenedesmus almeriensis* crecida en un fotobiorreactor de capa fina, alimentado por purín de cerdo diluido al 10% con agua. Esta biomasa fue cedida por la Universidad de Almería (UAL). El estudio se divide en dos ensayos en los que se utiliza este mismo tipo de biomasa, pero en los que la alimentación está dopada con compuestos diferentes: en el primer ensayo el purín se dopó con tres fármacos veterinarios comúnmente usados en granjas (sulfadiazina, tetraciclina y ciprofloxacino) y en el segundo con tres metales pesados (cobre, zinc y arsénico). Así mismo, se estudió la influencia de estos compuestos en los rendimientos de extracción de los principales macrocomponentes de la biomasa algal (proteínas y carbohidratos).

La finalidad de estudiar la composición bioquímica de las muestras es conocer la efectividad de diferentes métodos de extracción a partir del cálculo de los rendimientos de solubilización y recuperación de cada componente en función del método empleado y la influencia de los fármacos y los metales pesados. Los experimentos realizados se dividen en tres grandes grupos: 1) los que utilizan ultrasonidos, tanto por separado (UAE) como su empleo conjunto con enzimas (UAEE), 2) los basados en hidrólisis enzimática (con enzimas Protamex™ y Celluclast™) y 3) hidrólisis químicas en medio ácido (HCl) y básico (NaOH) a dos temperaturas (60 y 120°C). Se utilizaron diferentes técnicas para la determinación de los macrocomponentes: un método gravimétrico basado en una extracción con solventes orgánicos para los lípidos, un análisis de nitrógeno orgánico total mediante el método Kjeldahl para las proteínas y una hidrólisis ácida de los carbohidratos y posterior cuantificación de los monosacáridos generados mediante HPLC. Además, se analizó por ICP-OES la composición de metales de las muestras del segundo ensayo.

Los resultados de solubilizaciones de proteínas obtenidas con el primer ensayo con fármacos veterinarios revelan la formación de interacciones entre las proteínas y los fármacos que tan sólo los métodos químicos de extracción a 120°C son capaces de romper. Sin embargo, las solubilizaciones de carbohidratos sólo revelan interacción entre los fármacos veterinarios y la glucosa, ya que no hay diferencias significativas entre las solubilizaciones de xilosa conseguidas con la biomasa sin dopar y la dopada. Estas interacciones se rompen únicamente cuando se utiliza medio ácido. En cuanto al segundo ensayo con metales pesados, se deduce la formación de interacciones fuertes entre las proteínas y los metales, principalmente con el cobre; al igual que se detectan interacciones entre los carbohidratos y los metales, en este caso tanto con el cobre como con el zinc.

Se concluye que, en ambos casos, la mejor opción para conseguir unos rendimientos de solubilización y recuperación altos es emplear métodos químicos de extracción a 120°C. Sin embargo, los resultados óptimos de proteínas mejoran en medio básico y los de carbohidratos en medio ácido. Por otro lado, estos métodos a alta temperatura llevaron consigo también la recuperación de metales en la fase líquida, lo cual puede ser una desventaja para el posterior fraccionamiento o uso de este hidrolizado. Así mismo, la presencia de metales fue más influyente en los rendimientos de solubilización y recuperación, sobre todo en los procesos enzimáticos, que la presencia de fármacos.

# ABSTRACT

---

Throughout this work, the biochemical composition of microalgal biomass composed mainly of the species *Scenedesmus almeriensis* grown in a thin-layer photobioreactor, fed by pig slurry diluted 10% with water, was studied. This biomass was provided by the University of Almeria (UAL). The study is divided into two trials using the same type of biomass, but in which the feed is doped with different compounds: in the first trial the slurry was doped with three veterinary drugs commonly used on farms (sulfadiazine, tetracycline and ciprofloxacin) and in the second with three heavy metals (copper, zinc and arsenic). The influence of these compounds on the extraction yields of the main macrocomponents of the algal biomass (proteins and carbohydrates) was also studied.

The purpose of studying the biochemical composition of the samples is to know the effectiveness of different extraction methods by calculating the solubilization and recovery yields of each component depending on the method used and the influence of drugs and heavy metals. The experiments carried out are divided into three main groups: 1) those using ultrasound, both separately (UAE) and in conjunction with enzymes (UAEE), 2) those based on enzymatic hydrolysis (with Protamex™ and Celluclast™ enzymes) and 3) chemical hydrolysis in acid (HCl) and basic (NaOH) media at two temperatures (60 and 120°C). Different techniques were used for the determination of macrocomponents: a gravimetric method based on an extraction with organic solvents for lipids, an analysis of total organic nitrogen by the Kjeldahl method for proteins and an acid hydrolysis of carbohydrates and subsequent quantification of the monosaccharides generated by HPLC. In addition, the metal composition of the samples from the second test was analyzed by ICP-OES.

The results of protein solubilizations obtained with the first assay with veterinary drugs reveal the formation of protein-drug interactions that only chemical extraction methods at 120°C are able to break. However, carbohydrate solubilizations only reveal interaction between veterinary drugs and glucose, as there are no significant differences between xylose solubilizations obtained with undoped and doped biomass. These interactions are broken only when acidic medium is used. As for the second test with heavy metals, we deduce the formation of strong interactions between proteins and metals, mainly with copper; as well as interactions between carbohydrates and metals, in this case with both copper and zinc.

It is concluded that, in both cases, the best option to achieve high solubilization and recovery yields is to use chemical extraction methods at 120°C. However, the optimum results for proteins improve in a basic medium and those for carbohydrates in an acid medium. On the other hand, these high temperature methods also led to the recovery of metals in the liquid phase, which can be a disadvantage for the subsequent fractionation or use of this hydrolysate. Likewise, the presence of metals was more influential on the solubilization and recovery yields, especially in the enzymatic processes, than the presence of drugs.

## LISTADO DE TABLAS

---

Tabla 1. Concentraciones de proteínas, lípidos y carbohidratos en forma de porcentaje obtenidas para diferentes especies de microalgas (12).....	11
Tabla 2. Eficacia de eliminación de algunos fármacos en función del método empleado. Tabla adaptada de la referencia 22.....	15
Tabla 3. Algunos ejemplos de eficiencia de eliminación de metales pesados de las distintas especies de microalga empleada en cada caso. Tabla adaptada de la referencia 10.....	16
Tabla 4. Fármacos veterinarios que se han utilizado en el dopaje del efluente del fotobiorreactor y concentraciones en la que se han añadido. ....	24
Tabla 5. Metales pesados empleados como dopaje del efluente del fotobiorreactor, forma química en la que se presentan y concentración a la que se han añadido. ....	24
Tabla 6. Datos de los factores N-P calculados para cada una de las muestras tratadas. ....	27
Tabla 7. Resumen de los experimentos a realizar sobre las muestras de biomasa algal y los correspondientes códigos de identificación. ....	29
Tabla 8. Composiciones en base seca (%) de las biomásas iniciales sin dopar (SD) y dopada con fármacos veterinarios (D). Los resultados se expresan como medias $\pm$ desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). Los valores medios con la misma letra no son significativamente diferentes para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan. ....	33
Tabla 9. Composiciones en base seca sin cenizas (%) de las biomásas iniciales sin dopar (SD) y dopada con metales (D). Los resultados se expresan como medias $\pm$ desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). Los valores medios con la misma letra no son significativamente diferentes para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan. ....	35
Tabla 10. Valores de TOC (mg) obtenidos para las muestras sin dopar (SD) y dopadas (D) con metales pesados comparados con la suma de las pérdidas de carbohidratos y aminoácidos (mg) generadas en cada experimento y con las recuperaciones de carbohidratos (%) en cada caso. ....	51
Tabla 11. Comparación de los valores bibliográficos (63,64) de eficiencia de eliminación de metales (%RE) y capacidad de retención ( $q_i$ ) del cobre, el zinc y el arsénico sobre biomasa microalgal de <i>Scenedesmus almeriensis</i> con los valores obtenidos en este estudio. ....	54

# LISTADO DE FIGURAS

---

Figura 1. Representación del ciclo de Calvin para la fotosíntesis en una célula de microalga y las reacciones que tienen lugar. Imagen tomada de la referencia 4. ....	9
Figura 2. Esquema de las relaciones e intercambios de materia que tienen lugar entre las microalgas y las bacterias durante los respectivos procesos de fotosíntesis y oxidación. Ilustración tomada de la referencia 21..	13
Figura 3. Esquema de las capas estructurales que componen la pared celular de una microalga tipo <i>Scenedesmus</i> (38). PL: capa de pectina, AL: capa de algenan, FL: capa de celulosa y CM: membrana celular. ....	17
Figura 4. Comparación de los rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos (%) y las recuperaciones de carbohidratos y aminoácidos (%) de las muestras de biomasa sin dopar (SD) y dopada con fármacos veterinarios (D) en función del método de extracción aplicado. Los resultados se expresan como medias $\pm$ desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). ....	34
Figura 5. Comparativa de los rendimientos de solubilización (%) de proteínas y carbohidratos de las muestras de biomasa sin dopar (SD) y dopada (D) en función del tratamiento de extracción aplicado. Los resultados se expresan como medias $\pm$ desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). ....	37
Figura 6. Comparación de las solubilizaciones de proteínas y recuperaciones de aminoácidos conseguidas para cada tratamiento realizado a las muestras de biomasa alimentada con purines antes (SD) y después (D) de ser dopado con fármacos veterinarios. Los resultados se expresan como medias $\pm$ desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). ....	38
Figura 7. Comparación de las solubilizaciones y recuperaciones de glucosa (%) conseguidas para cada tratamiento realizado a las muestras de biomasa alimentada con purines antes (SD) y después (D) de ser dopado con fármacos veterinarios. Los errores de cada valor se calcularon mediante %SD. ....	40
Figura 8. Comparación de las solubilizaciones y recuperaciones de xilosa conseguidas para cada tratamiento realizado a las muestras de biomasa alimentada con purines antes (SD) y después (D) de ser dopado con CEs. Los resultados se expresan como medias $\pm$ desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). ....	42
Figura 9. Comparativa de las solubilizaciones de proteína (%) obtenidas para las biomazas sin dopar (SD) del ensayo 1 (fármacos veterinarios) y el ensayo 2 (metales pesados) en función del método de extracción aplicado. Los errores de cada valor se calcularon mediante %SD. ....	44
Figura 10. Comparativa de las capacidades de solubilización de proteínas y recuperación de péptidos para cada método de extracción al que se han sometido las muestras de biomasa alimentada con purín antes (SD) y después (D) de ser dopado con metales. Los resultados se expresan como medias $\pm$ desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). ....	45
Figura 11. Comparación de los rendimientos de solubilización de carbohidratos (%) obtenidos para las biomazas sin dopar (SD) de los ensayos 1 (fármacos veterinarios) y 2 (metales pesados) en función del método de extracción aplicado. Los errores de cada valor se calcularon mediante %SD. ....	46
Figura 12. Comparativa de las retenciones de carbohidratos (%) para las biomazas sin dopar (SD) de los ensayos 1 (fármacos veterinarios) y 2 (metales pesados) en función del método de extracción aplicado. Los errores de cada valor se calcularon mediante %SD. ....	47
Figura 13. Comparativa de las capacidades de solubilización y recuperación de glucosa (%) obtenidos para cada uno de los tratamientos a los que se han sometido las muestras de biomasa alimentada con purín antes (SD) y después (D) de ser dopado con metales. Los resultados se expresan como medias $\pm$ desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). ....	48
Figura 14. Comparativa de las capacidades de solubilización y recuperación de xilosa obtenidos para cada uno de los tratamientos a los que se han sometido las muestras de biomasa alimentada con purín antes (SD) y después (D) de ser dopado con metales pesados. Los resultados se expresan como medias $\pm$ desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). ....	49



Figura 15. Cromatograma adquirido por HPLC de la muestra de biomasa sin dopar del ensayo 2 tratada mediante el método de extracción por UAEE con enzima Protamex™. ....	50
Figura 16. Cromatograma adquirido por HPLC de la muestra de biomasa dopada con metales pesados tratada mediante el método de extracción por UAEE con enzima Protamex™. ....	50
Figura 17. Cromatograma adquirido por HPLC de la muestra de biomasa dopada con metales pesados tratada mediante el método de extracción por hidrólisis enzimática con enzima Celluclast™. ....	51
Figura 18. Gráficas de evolución de la eficiencia de eliminación del Cu, Zn y As en estudios de adsorción metálica sin remodelación del CO <sub>2</sub> por <i>Scenedesmus almeriensis</i> en soluciones multimetálicas (600 mg/L As, 150 mg/L Cu y Zn) a diferentes concentraciones iniciales de materia orgánica: control ( ), 40 mg/L pentona + 27.5 mg/L extracto de carne ( ), 80 mg/L pentona + 55 mg/L extracto de carne (•), 160 mg/L pentona + 110 mg/L extracto de carne (•). Obtenido de la referencia 63. ....	52
Figura 19. Gráfica de capacidades de retención ( <i>uptake capacity</i> , mg/g) a pH 7.0 para el Cu, Zn y As por diferentes especies de microalga en función del tiempo de exposición: disolución monometálica 3h (■), disolución multimetálica 3h (▨), disolución multimetálica 24h (■) y disolución multimetálica 72h (▨). CS: Chlorophyceae spp., SA: <i>Senedesmus almeriensis</i> , CV: <i>Chlorella vulgaris</i> y CR: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . Adquirido de la referencia 64. ....	53
Figura 20. Influencia del pH en las capacidades de adsorción metálica de Cu, Zn y As para diferentes biomazas microalgales. pH 5.5 (■), pH 7.0 (▨) y pH 9.5 (■) CS: Chlorophyceae spp., SA: <i>Senedesmus almeriensis</i> , CV: <i>Chlorella vulgaris</i> y CR: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . Gráficas adquiridas de la referencia (64). ....	54
Figura 21. Distribución (%) en las fases sólidas (FS) y líquidas (FL) del cobre (Cu), zinc (Zn) y arsénico (As) en función del tratamiento de extracción al que se ha sometido a la biomasa dopada con metales. Los errores se han calculado como %SD. ....	55

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Las microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos con un tamaño que oscila entre los 2-200  $\mu\text{m}$  y que suelen habitar en entornos acuáticos, tanto de agua dulce como salada. Pertenecen al grupo de las algas, que son organismos autótrofos y fotosintéticos encargados de abastecer de oxígeno atmosférico a ríos, lagos y mares. Aunque las microalgas carezcan de orgánulos complejos, son capaces de llevar a cabo los procesos intrínsecos de la fotosíntesis gracias a la presencia de pigmentos fotosintéticos en su interior celular, como es la clorofila. Se estima que existen más de 200,000 variedades diferentes de microalga (1).

Las microalgas constan de orgánulos simples unidos entre sí por membranas y posee también una pared celular rígida formada por una serie de capas con alto contenido en polisacáridos y glicoproteínas (2). Así mismo, tienen también un almacén de lípidos, que se forman durante la fotosíntesis y que funcionan como una fuente energética para la microalga. Como se ha mencionado anteriormente, las microalgas son, en general, autótrofas, es decir, que son capaces de generar sus propios nutrientes gracias a las reacciones de fotosíntesis. La fotosíntesis es un proceso metabólico que emplea el dióxido de carbono atmosférico ( $\text{CO}_2$ ) y la luz solar como materias primas para la producción de glucosa (compuesto orgánico) y oxígeno ( $\text{O}_2$ ), de tal manera que se fija el dióxido de carbono, pudiendo reducir su concentración en la atmósfera. El orgánulo capaz de llevar a cabo estos procesos es el cloroplasto, en cuyo interior está presente la clorofila que es un pigmento fotosintético. Las reacciones de la fotosíntesis vienen representadas en el ciclo de Calvin (*Figura 1*) (3): la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) reacciona con el  $\text{CO}_2$  para dar lugar a ácido 3-fosfoglicérido (3-PGA), que es el precursor de la glucosa, además de otros metabolitos. Este proceso es de vital importancia para la vida de todos y cada uno de los seres vivos de nuestro planeta, ya que permite sintetizar materia orgánica a partir de compuestos inorgánicos y, además, se fija y elimina  $\text{CO}_2$  y se libera  $\text{O}_2$ .

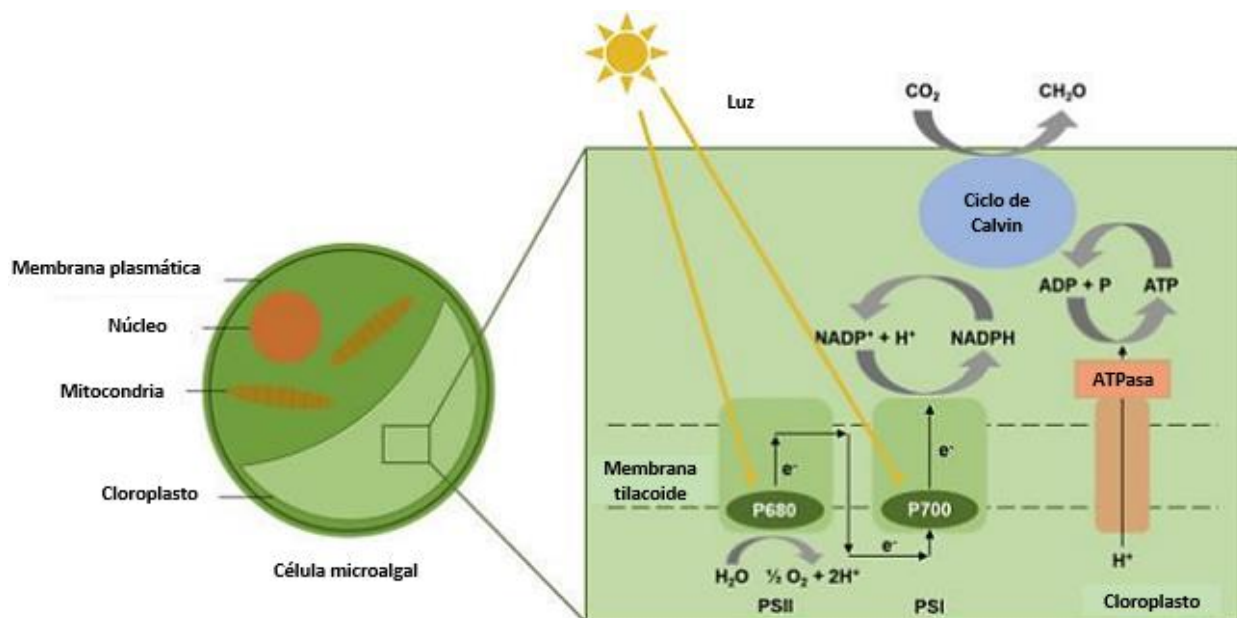


Figura 1. Representación del ciclo de Calvin para la fotosíntesis en una célula de microalga y las reacciones que tienen lugar. Imagen tomada de la referencia 4.

### 1.1.1 Antecedentes históricos de estudios con microalgas

Los primeros estudios conocidos realizados sobre cultivos de algas puras datan de 1890 y los realizó el microbiólogo holandés Beijerinck. La especie de alga utilizada fue *Chlorella vulgaris* y la finalidad del estudio era analizar la fisiología de estos organismos, aunque este objetivo no se pudo desarrollar completamente hasta la intervención de Warburg en el siglo XX. La primera producción masiva de microalgas tuvo lugar en Alemania durante la II Guerra Mundial con el objetivo principal de obtener lípidos y biocombustibles. Años más tarde, la sociedad científica se planteó la idea de que las microalgas podrían ser un suplemento, o incluso un sustitutivo, a las proteínas animales o vegetales empleadas hasta entonces para el consumo directo, tanto del ganado como del ser humano. El cultivo comercial de microalgas empezó a principios de la década de los 60 en Japón, con el cultivo de *Chlorella*, seguido por el cultivo de *Spirulina* en los 70 en México. En los años 80 ya existían 46 fábricas de producción de microalgas a gran escala en Asia, principalmente de *Chlorella*. En 1986 se inauguraron en Australia unas instalaciones de producción de *Dunaliella salina*, fuente de  $\beta$ -caroteno, dirigida por las empresas Biothecology Ltd. y Betatene Ltd., convirtiéndose este país en la tercera potencia mundial en la producción de microalgas. Al poco tiempo, se sumarían Israel y Estados Unidos, destacando también la aparición en la India de plantas de producción de cianobacterias más o menos al mismo tiempo (5).

Sin embargo, el interés sobre las microalgas no se basa únicamente en ser una fuente alternativa de lípidos o un suplemento alimenticio, sino también en su aplicación para el tratamiento de aguas residuales y la producción simultánea de compuestos de valor. La Universidad de Berkeley (California, EEUU) fue pionera en este aspecto en los años 50 (6). Oswald y Golueke desarrollaron en 1960 varios sistemas de producción masiva de microalgas de bioconversión de energía solar en metano e hicieron grandes progresos en las técnicas de depuración de aguas residuales mediante el empleo de microalgas. La biomasa generada en el proceso era valorizada posteriormente para obtener diferentes productos de valor añadido, lo cual suponía una reducción de los costes de producción y también derivaba en una ventaja sobre los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales (7). A pesar de haber sido una tecnología poco estudiada durante décadas, en los últimos años se encuentra en auge para la búsqueda de nuevos métodos más sostenibles con el medio ambiente y que permitan recuperar los nutrientes presentes en las aguas residuales a través de biorrefinerías, aplicando el concepto de la economía circular. La biomasa producida en estos procesos de tratamiento de aguas residuales está formada por una mezcla de microalgas y bacterias que funciona como un convertidor muy eficiente de energía solar y poseen una gran variedad de metabolitos o macrocomponentes (incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos y compuestos fenólicos, entre otros) y que son fuente de productos de interés y de alto valor añadido para diferentes industrias (8). El contenido de lípidos de este tipo de biomasa es muy reducido, por lo que la obtención de biocombustibles no resulta una industria económicamente rentable (9), ya que el coste de la producción de estos biocombustibles es, por el momento, más caro que para los combustibles fósiles. Otras aplicaciones de la biomasa obtenida sería el tratamiento por desgasificación y pirólisis para obtener gases de síntesis y biocarbón, la fermentación y la licuefacción hidrotermal para generar bioetanol y biobutanol. Además, es posible producir otros productos combustibles de carbono-neutro, biofertilizantes o bioplásticos (10).

### 1.1.2. Composición química de la biomasa algal

Los componentes mayoritarios de cualquier tipo de microalga son las proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos, pero la cantidad de cada uno depende de diversos factores como son: la especie de microalga, el tipo de medio donde se produce su crecimiento o incluso algún parámetro a controlar durante el periodo de cultivo (como la temperatura, el pH o la luminosidad) (11). Entre 2018 y 2020 se hicieron varios estudios para conocer de forma genérica la composición de las microalgas, analizándose diferentes especies. Se llegó a la conclusión de que el porcentaje de proteínas varía, aproximadamente, entre el 20-60%, el de lípidos entre

un 5 y un 25% y el de carbohidratos entre el 20 y el 30% (11,12,13). Los resultados obtenidos para cada especie de microalga se muestran en la *Tabla 1*.

<b>Especie de microalga</b>	<b>% Proteínas</b>	<b>% Lípidos</b>	<b>% Carbohidratos</b>
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	4-7	25-30
<i>Aphanizomenon flasaqua</i>	62	3	23
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	48	21	17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-20	14-18
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	6-7	13-16
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	4-9	8-14
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	44.2	24.6	25.2
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	40.5	26.3	25.1
<i>Nannoloropsis oculata</i>	39	17	20
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	61.3	2.8	21.7
<i>C.vulgaris remnants</i>	61.2	5.7	20.3
<i>Tetraselmis maculate</i>	52	30	15
<i>Tetraselmis sp</i>	60	15	24

**Tabla 1.** Concentraciones de proteínas, lípidos y carbohidratos en forma de porcentaje obtenidas para diferentes especies de microalgas (12).

Por otro lado, las microalgas necesitan nutrientes para su crecimiento, como el carbono, el fósforo, el nitrógeno y metales en concentración de trazas. Las aguas residuales contienen cantidades considerables de estos elementos en diferentes formas químicas, por lo que numerosos estudios se han centrado en el crecimiento de algas en este tipo de medios. Diversas investigaciones han permitido ver que tanto el medio de crecimiento como las condiciones de cultivo de las algas (nutrientes, temperatura, pH, intensidad de la luz, etc.) influyen en gran medida en la composición bioquímica final de éstas, ya que son factores determinantes de los procesos de síntesis de compuestos específicos tales como proteína, lípidos o carbohidratos (14,15,16).

Por norma general, cualquier tipo de agua residual engloba desechos orgánicos, desechos humanos y productos químicos domésticos o industriales entre otros, variando su proporción de una región a otra. Además, otro factor influyente en la proporción de nutrientes en el agua residual es la etapa de purificación en la que se encuentre: primario o secundario (16,17). En las aguas residuales primarias existe una gran cantidad de materia orgánica y sólidos en suspensión que pueden llegar a inhibir el crecimiento de las microalgas por fenómenos de competencia con bacterias heterótrofas y por la baja intensidad de la luz que les llega. Para las aguas residuales secundarias, la concentración de materia orgánica y sólidos en suspensión es menor, por lo que estos fenómenos no son tan importantes. No obstante, las microalgas son capaces de asimilar nitrógeno y fósforo en ambos tipos de efluente, aunque las características resultantes de la microalga al emplear un tipo de agua residual u otro puede variar (17). Estudios realizados por la Universidad de Cataluña en 2014 demostraron que la acumulación de lípidos se reduce en condiciones de presencia de nitrógeno y de estrés (19). Se ha demostrado también que la temporada estacional en la que se dé el crecimiento algal es determinante en cuanto a la composición de la biomasa (18), ya que se observó que la concentración de lípidos generados en verano es hasta un 20% más alta que la que se consigue en invierno. La explicación es la diferente concentración de amonio ambiental en las aguas residuales (de 12 mg/L en verano a 30.7 mg/L en invierno). Respecto a la producción de proteínas, se ha observado que ésta disminuye

en condiciones de falta de nitrógeno, aumentando en su lugar el contenido en lípidos y carbohidratos de la microalga (19).

Para conseguir un proceso viable, hay que diseñar un proceso de valorización fraccional que resulte rentable, mejorando de forma importante los rendimientos y reduciendo los costes. Estos procesos deben adecuarse a la composición de la biomasa, por ejemplo, una biomasa microalgal con bajo contenido de lípidos y pared celular muy resistente no es una materia prima adecuada para la producción de biocombustibles. Además, hay que tener en cuenta que la presencia de bacterias o contaminantes como los metales pesados y/o antibióticos impiden su utilización en la industria cosmética o de la alimentación, afectando a las alternativas de valorización. Cuando se trabaja con biomasa microalgal crecida en aguas residuales, es imprescindible estudiar la seguridad y la toxicidad de los productos obtenidos (20).

## 1.2. Utilización y aplicaciones de las microalgas

Varios estudios realizados predicen para el año 2030 que la demanda de agua generará un déficit de hasta el 40%, siendo las industrias, las zonas urbanas y los procesos de contaminación de los suelos las principales fuentes de este déficit. A esto se le suma la gran cantidad de vertidos irregulares de aguas residuales sobre masas de agua superficiales y subterráneas, provocando la aparición de eutrofización en el medio. Debido a esos problemas, el desarrollo de procesos eficientes para la purificación y recuperación de las aguas residuales (biorremediación) es esencial para evitar cualquier impacto negativo en el medio ambiente. Sin embargo, los métodos convencionales de tratamiento de aguas tienen diversas desventajas, como son las emisiones de gases de efecto invernadero, la necesidad de un gran aporte energético, el desperdicio de recursos con capacidad de ser reciclados y la generación de grandes cantidades de residuos sólidos (10). Era necesaria la búsqueda de un método alternativo que no presentase tantos problemas y en la década de los años 1950 Oswald y Golueke propusieron el uso de microalgas como método de biorremediación de aguas residuales. Al ser resistentes a condiciones adversas y tóxicas, pueden utilizarse para tratar diferentes tipos de agua residual, tanto de origen doméstico como industrial o agrícola y ganadero. Las microalgas son capaces de emplear la luz solar que llega a la superficie de la masa de agua residual como fuente de energía para su crecimiento y también para fijar los nutrientes del medio, eliminándolos del medio acuático. Como las microalgas necesitan CO<sub>2</sub> como materia prima para su crecimiento, reducen así mismo su contenido en el agua. Además, el tratamiento de aguas residuales con microalgas no requiere de un suministro constante de oxígeno, sino que, al ser organismos autótrofos y fotosintéticos, se obtiene O<sub>2</sub> y es posible reducir la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) (10).

### 1.2.1. Mecanismos de tratamiento y biorremediación de aguas residuales con microalgas

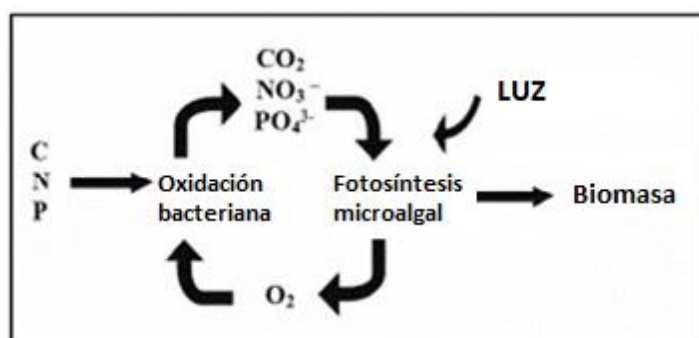
Existen más de 200,000 variedades de microalgas, cada una con unas características diferentes y, por lo tanto, con capacidades distintas para la eliminación de contaminantes del agua residual. Hay que realizar estudios previos para determinar cuál es la especie de microalga más adecuada para inocular en un reactor de tratamiento de un agua residual concreta. Estos estudios previos se basan en dos factores principales, la capacidad de la microalga para eliminar la contaminación provocada por la materia orgánica y la capacidad de crecer en presencia de contaminantes específicos (10).

Las aguas residuales pueden contener elevadas concentraciones de componentes que pueden inhibir el crecimiento de las microalgas, afectar al pH del agua y a su turbidez, por lo que a veces es necesario realizar un tratamiento previo al agua residual con el fin de conseguir las condiciones óptimas para el crecimiento de las microalgas (10). En 2017, el grupo de Lin desarrolló un método innovador para el tratamiento con

microalgas de aguas residuales de la industria textil y que constaba de tres etapas: la primera era una adsorción de compuestos tóxicos mediante carbón activo, seguida de una digestión anaeróbica y con una última etapa de reducción de la carga del agua residual. En algunos tipos de agua residual, puede darse que la concentración de nitrógeno amoniacal en el agua residual sea tal que llegue a inhibir el crecimiento de la microalga en lugar de favorecerlo. Una de las prácticas más comunes para reducir su contenido es la dilución del agua residual hasta alcanzar niveles dentro de los límites de tolerancia de la microalga, cuyo máximo es alrededor de 1000  $\mu\text{mol NH}_4\text{-N/L}$  (10).

### Consortio microalga-bacteria

En el tratamiento de aguas residuales con el consorcio de microalgas y bacterias se crea una relación simbiótica entre ambos organismos (21). Las microalgas generan oxígeno como producto de la fotosíntesis, el cual es utilizado por las bacterias para la degradación de la materia orgánica hasta  $\text{CO}_2$ . Este  $\text{CO}_2$  es materia prima de las microalgas para la fotosíntesis, de esta forma se consigue un proceso cíclico. Además, las bacterias generan diversos productos tales como la vitamina B12 o sideróforos que están implicados en el crecimiento de la microalga. La *Figura 3* muestra de forma esquemática esta relación entre bacterias y microalgas (21). Esta relación de simbiosis es beneficiosa para ambos y también para el objetivo de alcanzar niveles de eliminación de contaminantes mucho mayores (10). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la presencia de bacterias puede afectar a las características de la biomasa, a la posterior valorización de la biomasa y a sus futuras aplicaciones (22).



**Figura 2.** Esquema de las relaciones e intercambios de materia que tienen lugar entre las microalgas y las bacterias durante los respectivos procesos de fotosíntesis y oxidación. Ilustración tomada de la referencia 21.

### 1.2.2. Empleo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales de purín de cerdo

El incremento poblacional que se está viviendo ya desde hace varias décadas, lleva consigo un aumento considerable del consumo de carne, siendo la carne de cerdo una de las más demandadas. Esto conlleva una gran expansión de la ganadería porcina, lo cual deriva en una generación cada vez mayor de purines (agua residual porcina). Los purines contienen importantes cantidades de materia orgánica y nutrientes. Pero, desde la década de los 50 del siglo XX (cuando se comenzó con estas prácticas en las granjas), presentan también concentraciones significativas de fármacos veterinarios y metales pesados, debido al empleo de los primeros para la cura de enfermedades de los animales y a que los productos de alimentación de los cerdos contienen metales, tales como Cu y Zn, a nivel de trazas como promotores del crecimiento (22,23). Estudios realizados en Alemania en 2012 demostraron la presencia de cobre, zinc, níquel, plomo, cromo y cadmio en intervalos de concentración de 22.4 - 3387.6 mg, 93.0 - 8239.0 mg, 3.1 - 97.3 mg, 2.0 - 26.7 mg, 1.1 - 32.0 mg y 0.08 - 5.30 mg por cada kilogramo de purín líquido (en base seca), respectivamente (24). En este trabajo se estudia también el efecto del arsénico porque este metal está presente en los pozos de los que la mayoría de las granjas de nuestra región toman el agua con el que se da de beber a los cerdos (25). Los fármacos entran dentro del grupo de los contaminantes emergentes (CEs) (26) y son utilizados por los ganaderos para

tratar diferentes enfermedades comunes en los cerdos y de aditivos alimenticios que favorecen el crecimiento del animal. La problemática radica en que el 20 - 30% de los fármacos y metales pesados suministrados acaban en los purines, ya que son excretados por los cerdos en forma de heces, orina o metabolitos. Al emplearse en su mayoría como fertilizantes o almacenándose en balsas, se convierten en fuentes de contaminación que afectan a la salud humana y al medio ambiente por su contenido en metales pesados y fármacos, a lo que hay que sumar el efecto de la creación de resistencia a los antibióticos de las bacterias presentes en las aguas (27).

Los fotobiorreactores (*photobioreactors*, PBR) han proporcionado buenos resultados de tratamientos de purines. En un principio se desarrollaron para el cultivo masivo de microalgas y para su correcto funcionamiento necesitan un control constante de las condiciones de trabajo: pH, temperatura, concentración de O<sub>2</sub> disuelto, concentración de los nutrientes de crecimiento y disponibilidad de luz. Los fotobiorreactores más empleados para el tratamiento de aguas residuales son de tipo abierto, que ofrecen un menor control de los parámetros, pero a menor coste, generando una biomasa compuesta de un consorcio microalga-bacteria (27).

### 1.2.3. Problemática de los fármacos veterinarios

Dentro de los contaminantes emergentes, los fármacos son los que se consideran más preocupantes por ser compuestos orgánicos refractarios, es decir, resistentes a los tratamientos convencionales o con un proceso de degradación biológica muy lenta. Por eso, aunque la cantidad de fármacos que acaben depositados en el agua es baja, se van acumulando hasta alcanzar unas concentraciones tales que pueden generar alteraciones tanto en el medio acuático como en los organismos que habitan en él. Entre los medicamentos más usados y que más se encuentran en purines de cerdo están la tetraciclina, la ciprofloxacina y la sulfadiazina (28). La tetraciclina (TET), es un bactericida utilizado como antibiótico contra infecciones causadas por microorganismos Gram (+) y Gram (-), micoplasma, clamidia, rickettsia y parásitos protozoarios. Sin embargo, sólo una pequeña parte de estos fármacos es absorbida o metabolizada, ya que un 75% es excretado por vía de la orina o las heces, llegando a contaminar el ecosistema tanto acuático como terrestre. Este tipo de fármacos intervienen en la inhibición del crecimiento y el desarrollo de especies acuáticas y se bioacumulan, entrando en la cadena trófica y llegando a provocar enfermedades tales como neuropatías, alteraciones endocrinas, disfunciones del sistema nervioso central, mutaciones genéticas o fotosensibilidad (29). La ciprofloxacina (CIP) es otro fármaco antibacteriano perteneciente al grupo de las quinolonas, concretamente a las fluoroquinolonas, muy empleado en la industria ganadera y las piscifactorías, sobre todo para el tratamiento de enfermedades generadas por las bacterias *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Cytophaga* en acuicultura. Las quinolonas presentan un elevado tiempo de residencia en el medio acuático, lo cual las hace susceptibles de ser bioacumuladas por los organismos que habitan en el agua. El principal problema de las quinolonas es que favorecen la resistencia bacteriana, lo cual puede transmitirse a lo largo de la cadena trófica (30). Otro fármaco utilizado ampliamente en medicina veterinaria es la sulfadiazina (SDZ), del grupo de las sulfonamidas, que posee carácter bactericida frente a un gran número de enfermedades e infecciones. Se ha demostrado que su toxicidad depende del pH, ya que en medios ácidos predomina la forma iónica, que tiene mayor tendencia a ser bioacumulada y ascender en la cadena trófica (31).

Los métodos convencionales de tratamiento de las aguas residuales para la eliminación de fármacos son físico-químicos (*Tabla 3*): coagulación, floculación, ultrafiltración con membranas, oxidación y adsorción. Pero estos procesos implican una gran variedad de desventajas, tales como la necesidad de un gran aporte energético y la adición constante de productos químicos que generan grandes cantidades de subproductos tóxicos. Los tratamientos de oxidación por fotocátalisis nanoestructurada son más estables químicamente, pero no son aplicables a grandes masas de agua debido al elevado coste de las lámparas de ultravioleta. Los

tratamientos de filtración por membrana, sobre todo el método de ósmosis inversa, son muy eficaces para la eliminación de fármacos, pero su alto coste energético los convierte en una alternativa no viable. Por último, existe el tratamiento por biorremediación o fitorremediación, que utiliza microalgas, plantas, hongos o bacterias y puede ser muy efectivo para la eliminación de compuestos orgánicos tóxicos y biodegradables en suelos y aguas residuales. Aunque en algunos casos se necesita una inversión inicial grande para la construcción de las instalaciones, las microalgas han resultado ser capaces de eliminar grandes cantidades de contaminantes orgánicos como los fármacos (26).

Tratamiento	Método	Fármaco	% Eliminación
Físico-químicos	Coagulación	Aspirina	< 20%
	Ozono	Ibuprofeno DCF	90% 90%
Avanzados	Extracción asistida por ultrasonidos	Ibuprofeno DCF	93% 88%
	Ultrafiltración	Ibuprofeno DCF	50 - 80% 85%
	Oxidación avanzada	Ibuprofeno DCF	90% 90%
	Reactores de lecho móvil	Ibuprofeno DCF Aspirina	94% 76% 91%
Biológicos	Lodos activados	Ibuprofeno Aspirina	12 - 86% 90%
	Humedales	Ibuprofeno DCF Aspirina	80 - 91% 17 - 52% 35 - 89%
	Filtros biológicos	DCF Aspirina	< 80% 69%
	Microalgas	DCF	40 - 99%

Tabla 2. Eficacia de eliminación de algunos fármacos en función del método empleado. Tabla adaptada de la referencia 22.

Los datos registrados en a *Tabla 2* no aportan una conclusión precisa sobre cuál es la mejor opción para la eliminación de CEs, pero teniendo en cuenta los altos rendimientos de eliminación sumado a la ventaja que conlleva poder realizar una valorización posterior de la biomasa producida en el proceso, la biorremediación puede llegar a ser una técnica muy beneficiosa. Resulta de especial interés el empleo de algas o microalgas para la transformación o eliminación de los contaminantes y nutrientes presentes en el agua. Se considera que es un proceso global por ser capaz de eliminar sales, lo que conlleva un aumento de pH de los efluentes, de eliminar el nitrógeno amoniacal, reducir la demanda biológica de oxígeno y oxigenar el agua gracias a la fotosíntesis y oxidar la materia orgánica y reducir el contenido de CO<sub>2</sub> del agua por la misma razón. Además, han resultado ser también una muy buena opción para la eliminación de pesticidas y herbicidas, ya que las microalgas son capaces de bioacumular diversas sustancias tóxicas sin sufrir efectos adversos sobre su actividad biológica (26).

#### 1.2.4. Problemática de los metales pesados

Aunque las microalgas necesitan concentraciones a nivel de trazas de determinados metales para poder realizar las actividades de crecimiento, concentraciones elevadas de estos metales pesados pueden inhibir su crecimiento. Las microalgas pueden capturar determinados metales pesados (Cd, Hg, Ni, Zn, Fe, Cu, Pb, Cr, etc.) mediante tres mecanismos diferentes: acumulación o precipitación extracelular, adsorción o complejación de la superficie celular (tanto en células muertas como en vivas) y acumulación intracelular, que requiere de actividad microbiana para poder tener lugar (32). Las paredes celulares de las microalgas



están formadas por compuestos que poseen grupos funcionales con carga negativa, tales como grupos amino, hidroxilo, carboxilo, etc. Estos grupos son un centro activo para la unión de cationes metálicos y los procesos de adsorción ocurren muy rápidamente hasta que se alcanza la saturación. Sin embargo, no todas las especies de microalga poseen la misma eficiencia en la captura de metales, sino que puede variar en gran medida. Muchos metales pesados son esenciales para el metabolismo de las microalgas, actuando como micronutrientes, como el cobre y el zinc, pero si las concentraciones aumentan su toxicidad afecta a la morfología celular, el crecimiento y la actividad biológica de las microalgas (33,34). Los mecanismos mediante los cuales provocan estas alteraciones son el desplazamiento de las uniones del metal con las moléculas biológicas, inhibición de la actividad enzimática y pérdida de la estructura de los ácidos nucleico, pero los efectos generados dependen tanto del metal como del tiempo de exposición (34). La *Tabla 3* muestra las capacidades de eliminación de diferentes metales para diferentes tipos de microalga (10).

Metal	Concentración inicial de metal (mg/L)	Especie de microalga que forma la biomasa	Eficiencia de eliminación (%)
<b>Cadmio</b>	0.5	<i>Scenedesmus sp.</i> (pura)	73
	100	<i>Chlorella sp.</i> (pura)	33 - 41
	5	<i>Chlorella vulgaris</i> (pura)	66
<b>Cromo</b>	227	<i>Chlorella vulgaris</i> (pura)	51 - 80
	10	<i>Scenedesmus sp.</i> (pura)	93
	10-100	<i>Spirulina sp.</i> (pura)	83
<b>Cobre</b>	56.6	<i>Spirulina máxima</i> (pura)	95
	56.6	<i>Chlorella vulgaris</i> (pura)	96
	60	<i>Scenedesmus obliquus</i> (pura)	72 - 92
<b>Mercurio</b>	0.3-0.8	<i>Chlorella vulgaris</i> (pura)	79 - 86
	10-200	<i>Chlorella vulgaris</i> (pura)	34 - 93
	10	<i>Psuedochlorococcum typicum</i> (pura)	97
<b>Zinc</b>	1-50	<i>Chlorella sp.</i> (pura)	60 - 70
	30	<i>Synechocystis sp.</i> (pura)	40
	30	<i>Scenedesmus sp.</i> (pura)	98

**Tabla 3.** Algunos ejemplos de eficiencia de eliminación de metales pesados de las distintas especies de microalga empleada en cada caso. Tabla adaptada de la referencia 10.

Entre todas las especies, la microalga *Scenedesmus* es la que parece dar los mejores resultados en la reducción de la concentración de metales pesados, ya que tiene porcentajes de eficiencia de eliminación altos para varios metales.

Los tratamientos convencionales empleados en las industrias para tratar las aguas residuales de los efluentes son efectivos para la eliminación de la actividad biológica y los componentes físicos, pero no para los metales pesados. Se ha estudiado la utilización de métodos de mecanismos de adsorción por carbón activo, que, aunque es una tecnología muy efectiva, es muy costosa (35). El tratamiento de aguas residuales en reactores de microalgas es una técnica de bajo coste y con la que se consigue hasta un 99% de eliminación de metales, que varía en función del metal y del tipo de microalga utilizada. Además, las microalgas poseen una gran capacidad de adaptación y de supervivencia en ambientes contaminados por metales pesados (36).

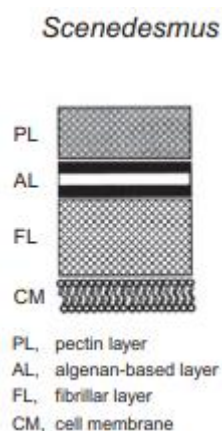
### 1.3. Valorización de las microalgas

Después del proceso de tratamiento de aguas residuales o purines, la biomasa algal producida puede emplearse para la producción de más productos mediante un proceso de valorización. A la hora de llevar a cabo esta valorización de la microalga hay que tener en cuenta que los macrocomponentes (lípidos, proteínas y carbohidratos) se encuentran mayoritariamente en el interior celular, pero también pueden estar en la

pared (36). La pared celular de las microalgas separa el contenido intracelular del medio ambiente, la preserva y la protege de agentes externos, tanto invasores como el entorno (37), por lo que la ruptura de ésta es crucial para la biodisponibilidad y la solubilización y recuperación de los componentes bioquímicos de la microalga. Por eso, es imprescindible hacer un proceso de elección del método más adecuado para conseguir la mejor ruptura de la pared posible (rotura celular) (36), pero minimizando la degradación de los componentes solubilizados.

### 1.3.1 Mecanismos de ruptura de la pared celular de la microalga

La estructura y composición de la pared celular de las microalgas es muy variada y puede constar de únicamente una fina membrana a incluso tener varias capas complejas. En el caso de la especie *Scenedesmus*, la pared celular está compuesta por tres capas (*Figura 3*): la más interna y cercana a la membrana celular es celulósica y delimita la extensión de la célula individual, la siguiente está formada por algenan (un biopolímero muy resistente) y la más externa es de carácter peptídico y es la encargada de agrupar a las células en cenobios (37).



**Figura 3.** Esquema de las capas estructurales que componen la pared celular de una microalga tipo *Scenedesmus* (38). PL: capa de pectina, AL: capa de algenan, FL: capa de celulosa y CM: membrana celular.

Se conocen muchos métodos para conseguir la rotura celular y extracción de compuestos y se clasifican según la naturaleza del método utilizado para conseguirlo. Se diferencian los siguientes tipos de procedimientos de rotura celular (37,39):

#### 1.3.1.1. Métodos físicos

##### Molino de bolas

Los métodos físicos se basan en la rotura de la pared celular por ejercer directamente sobre la microalga una fuerza física y presión. El más utilizado es el molino de bolas por su sencillez. Las bolas pueden estar hechas de cerámica, vidrio, plástico o hierro (27). Estas bolas se alojan en el interior de una cámara de molienda y la pared celular se fractura como consecuencia de tres fenómenos: la colisión de las células con las bolas a diferentes velocidades, el esfuerzo de cizallamiento que sufren las células debido a la aceleración de las bolas contra la pared de la cámara y la fuerza centrífuga de las paredes de la cámara de molienda (39). Se utilizan también mecanismos de prensado (de tornillo, de expulsión, de pistón, etc.) para comprimir las células de la microalga y conseguir romper la pared, extrayendo así mejor el contenido (37). Este método presenta varios parámetros que determinan la eficacia de la rotura de la pared, que son: la geometría de la cámara de molienda, la concentración de biomasa utilizada, la velocidad de agitación, el caudal de suspensión, la proporción de llenado de la cámara, el tipo de material utilizado como bola de molienda y su diámetro (39). Por ejemplo, empleando como material de molienda perlas de  $ZrO_2$  estabilizadas con  $Y_2O_3$  de 0.4mm de diámetro en una cámara horizontal de 75mL lleno al 65%, agitando durante 10 minutos a una

velocidad constante de 2039 rpm y con una concentración de biomasa *Chlorella vulgaris* de 25 g/L, se consiguió un rendimiento de recuperación de proteínas del 40% (40).

No obstante, este método no fue el elegido para el estudio debido a que atendiendo a los resultados obtenidos en estudios previos por la Universidad de Valladolid (40), trabajando con microalgas de pared celular resistente como *Scenedesmus*, el molino de bolas aporta rendimientos de extracción bajos.

#### Ultrasonidos (*Ultrasound Assisted Extraction, UAE*)

Las ondas generadas por los ultrasonidos hacen que se formen microburbujas como consecuencia de las continuas variaciones de presión del medio líquido. Esas microburbujas se forman en las etapas de baja presión e implosionan en los ciclos de alta presión, generando ondas de choque que provocan vibraciones, picos de temperatura extremos y fenómenos de termólisis del agua a su alrededor que dan lugar a la formación de radicales libres que permiten romper la pared celular (37). Los ultrasonidos se consideran una técnica verde y que permite reducir el tiempo del tratamiento y el volumen de disolvente empleado a la vez que el rendimiento del proceso aumenta respecto a otros métodos convencionales (39). Se ha demostrado que las ondas de baja frecuencia (desde 18 a 40 kHz) son más eficientes para la extracción, aunque depende en gran medida de la especie de microalga de la que se trate por las diferencias de tamaño, forma y estructura celular (37). Los factores que afectan en mayor medida al proceso son la viscosidad del disolvente (el más común es el agua), su saturación, su presión de vapor, la tensión superficial, el tiempo de exposición, la frecuencia empleada y la temperatura del proceso, que si aumenta de forma incontrolada puede perjudicar a las propiedades de los componentes extraídos (39). La bibliografía muestra rendimientos de extracción de proteínas del 76% cuando se emplea una suspensión de *Chlorella vulgaris* de 0.2 g/L durante 10 minutos a una potencia de 1000 W en medio acuoso de NaOH 0.4M. Aunque este rendimiento se reduce al 35% cuando se emplea medio HCl 0.4M o agua (39).

Este fue uno de los métodos de extracción seleccionados para este estudio, ya que las mismas investigaciones previas que las indicadas en el caso del molino de molienda (40) indicaron que los rendimientos de extracción de proteínas y carbohidratos cuando se emplea UAE son considerablemente mayores a los conseguidos con el molino de bolas.

#### Microondas (*Microwave Assisted Extraction, MAE*)

La técnica de microondas se ha utilizado ampliamente como tratamiento térmico alternativo para muestras de biomasa algal. Las frecuencias más comunes para producir la rotura celular rondan los 2.45 GHz. El fundamento de esta metodología se basa en las interacciones que se dan entre el campo electromagnético producido por las ondas de microondas con el agua y las moléculas polares, que inducen a la vibración de estos compuestos y a un aumento de su temperatura de los líquidos intracelulares. Este calentamiento produce la evaporación de los disolventes del interior celular, de tal manera que hay un incremento de la presión intracelular, produciéndose así la rotura de la pared (37,39). Los tratamientos de extracción con microondas se basan en la combinación de mecanismos de transporte por gradiente de temperatura y gradiente de masa. De esta forma, se aceleran los procesos y se alcanzan mejores rendimientos de extracción, además de ser procesos más selectivos (39). Los parámetros que determinan una buena extracción son la concentración de la biomasa, el tiempo de trabajo y la potencia que se indique. Es un procedimiento robusto, sencillo y eficiente, aunque la eficiencia depende enormemente del tipo de microalga del que se trate (37,39). Bibliografía previa mostró porcentajes de recuperación de proteínas del 63% cuando se sometía una muestra de biomasa *Chlorella vulgaris* en medio acuoso a un ciclo de trabajo del 80% a una potencia de 100 W durante 120 segundos.

La utilización de MAE como método de extracción en el estudio se descartó por dos razones. Durante el tiempo de desarrollo de la investigación el sistema estaba averiado y no era posible usarlo; pero además los

datos previamente recogidos por investigadores del grupo indicaban que los rendimientos de solubilización de proteínas obtenidos con MAE eran menores que los alcanzados con UAE y las recuperaciones de carbohidratos fueron muy reducidas (41).

Las principales ventajas de estos métodos físicos son la baja degradación de los productos obtenidos y el corto tiempo de tratamiento requerido. Sin embargo, destaca el alto consumo energético (lo que reduce su viabilidad) y los bajos/moderados rendimientos de solubilización y recuperación.

### *1.3.1.2. Métodos químicos*

Los métodos químicos pueden ser más eficaces que los físicos, ya que se producen interacciones entre el disolvente con el que se hace la extracción-rotura y los componentes de la pared celular. Además, estos métodos suelen requerir un menor aporte energético y la eficiencia conseguida para la rotura celular es alta (38). Existen dos tipos:

#### *Hidrólisis alcalina o ácida*

Los medios ácidos más utilizados son ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y el ácido clorhídrico (HCl), mientras que el básico más común es el hidróxido sódico (NaOH), todos ellos en concentraciones comprendidas entre el 1 y el 5%. En muchas ocasiones, estos tratamientos se combinan con condiciones de moderada o alta temperatura (más de 60°C) con el fin de mejorar la eficacia de la extracción (37). Estudios previos realizados por el mismo grupo del ISP (41) demostraron que las eficacias de extracción aumentaban significativamente a 120°C, pero apenas había diferencia entre los rendimientos obtenidos a 40 y 60°C, siendo algo más bajos a menor temperatura. Una posible explicación a los menores rendimientos de extracción conseguidos a baja temperatura es el hecho de que, al ser un tratamiento menos energético, no se consigue descomponer la pared celular de la biomasa, impidiendo completar la hidrólisis de los azúcares e impidiendo su extracción (41). Por eso se decidió que en este estudio las temperaturas de trabajo a elegir para llevar a cabo los experimentos de extracción fueran 120 y 60°C. Las hidrólisis ácidas permiten degradar los polímeros de las paredes celulares de la microalga; mientras que las hidrólisis básicas destruyen la pared celular y permiten solubilizar los compuestos orgánicos presentes, especialmente las proteínas. Cuando estos ensayos se combinan con una muy elevada temperatura (más de 100°C) se pueden degradar los compuestos extraídos por desnaturalización de las proteínas o racemización de los azúcares (39). Estos métodos tienen además la desventaja de ser poco selectivos y generar múltiples tipos de subcompuestos por la degradación de los productos de interés, disminuyendo así los rendimientos de recuperación (37).

Estudios realizados en 2021 en la Universidad de Valladolid obtuvieron porcentajes de solubilización de proteínas superiores al 80% cuando se usaba medio NaOH 0.5 o 2.0 M, ambos a una temperatura de trabajo de 60°C. No obstante, en medio ácido HCl el rendimiento de solubilización cae al 50% cuando se emplea una concentración 0.5 M y asciende al 76% cuando se emplea HCl 2 M. En estudios previos se ha visto que en pH básico se extrae mejor la proteína y que en medio ácido se consiguen buenos rendimientos de extracción de carbohidratos (40).

Miembros del equipo en que se ha desarrollado este trabajo realizaron en 2019 un estudio sobre la extracción de macrocomponentes (lípidos, proteínas y carbohidratos) de biomasa microalgal crecida en biorreactores alimentados con purín de cerdo mediante hidrólisis básica seguida de precipitación en medio ácido. Los rendimientos de solubilización de carbohidratos y proteínas se vieron favorecidos cuanto más elevado fuera el pH y más fuertes fuesen las condiciones de trabajo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que se corre el riesgo de que las proteínas se desnaturalicen y los carbohidratos se transformen en compuestos más pequeños, de tal forma que se produzcan pérdidas y las recuperaciones sean más bajas (42).

Este equipo estudió también en 2021 la capacidad de extracción de macrocomponentes de microalgas crecidas en un biorreactor alimentado con purín de cerdo empleando métodos de hidrólisis en medio ácido o básico. Concluyeron que los rendimientos de solubilización de carbohidratos en medio HCl 2M llegaban a ser del 98% y del 80% en el caso de las proteínas, siendo en ambos casos considerablemente más altos que los conseguidos a pH no tan extremos (HCl 0.5M), por lo que la extracción en medio ácido es una muy buena opción (43).

#### *1.3.1.3. Métodos biológicos: hidrólisis enzimática*

La hidrólisis enzimática es una alternativa verde a los métodos de extracción convencionales y que aporta resultados más selectivos (39). Se basa en el empleo de diferentes tipos de enzima para la transformación de los carbohidratos en monosacáridos y de las proteínas en péptidos o aminoácidos, lo cual lleva a la rotura celular. El tipo de enzima utilizado determina las condiciones de operación (temperatura, pH, concentración de la biomasa y de la enzima, etc.) y la eficacia del proceso. Las más utilizadas son las proteasas, celulasas, glicosidasas, amilasas, xilanasas, peptidasas y lipasas (37,39). El principal inconveniente de estos métodos es el alto coste de las enzimas, que hace que reduce la viabilidad económica del proceso; además de que apenas haya estudios que describan el papel de las enzimas en la rotura de la pared celular y que los rendimientos de extracción aún son bajos en comparación a otros métodos (39).

Para este trabajo fueron escogidas dos enzimas para ser aplicadas: la enzima Protamex™ y la enzima Celluclast™. La primera de ellas resulta interesante para el estudio por ser una proteasa con capacidad de extraer proteínas y romper enlaces existentes entre ellas, de tal manera que se facilita su solubilización en el medio de extracción y permite obtener péptidos de mayor tamaño. Además, ha resultado ser una buena opción para la obtención de péptidos de tamaño medio (22,44). En cuanto a la segunda, es una enzima de tipo celulasa cuya finalidad es la de degradar los polisacáridos que constituyen de forma mayoritaria la pared celular de la biomasa microalgal (22,44).

En el año 2021 la Universidad de Valladolid realizó estudios sobre la utilidad de realizar hidrólisis enzimáticas para una eficaz valorización de los macrocomponentes de biomasa microalgal crecida en un biorreactor alimentado por purín de cerdo. Para ello utilizaron tres tipos de enzima: Alcalasa™, Protamex™ y Celluclast™. Los resultados concluyeron que la enzima celulasa promovía la solubilización de carbohidratos, obteniéndose buenos rendimientos de recuperación. Las imágenes recogidas por microscopía SEM permitieron saber que el enzima favorecía la degradación de la pared celular. Del mismo modo, cuando se emplea enzima proteasa la solubilización de proteínas mejora significativamente, observando también por microscopía SEM el daño realizado sobre la estructura de la pared celular (22).

#### *1.3.1.4. Métodos combinados*

Las anteriores técnicas de rotura celular pueden combinarse con el fin de mejorar la eficacia de la extracción y así conseguir una recuperación más fiable de los macrocomponentes de la microalga. Los métodos que han proporcionado mejores resultados en estudios previos son las hidrólisis enzimáticas asistida por ultrasonidos (UAEE) y la hidrólisis enzimática asistida por microondas (MAEE).

#### *Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos (UAEE)*

La hidrólisis enzimática y los ultrasonidos son considerados métodos complementarios gracias al carácter hidrolítico de las enzimas y de disrupción de los ultrasonidos, por lo que se espera que combinarlos aporte un resultado mejor que el de cada uno por separado. Al efecto favorable que ejercen las enzimas sobre la recuperación de carbohidratos y proteínas al degradar y alterar las paredes y membranas celulares se le suma la capacidad de los ultrasonidos de penetrar en la pared celular y provocar su ruptura, facilitando el acceso de la enzima al interior celular y, por lo tanto, la extracción de los macrocomponentes. Además, la aplicación de ultrasonidos mejora la transferencia de masa tanto fuera como dentro de la matriz permitiendo extraer

una mayor cantidad de compuestos (45). Algunos estudios han reportado que los ultrasonidos de baja frecuencia y en determinadas condiciones de trabajo pueden mejorar la actividad enzimática de la celulasa. Y también se ha observado en alguna ocasión que la presencia de la enzima favorece y potencia aún más el efecto que ejercen los ultrasonidos (45). En este tipo de experimentos, la viscosidad del sistema (disolvente + muestra) es fundamental, sobre todo cuando se usa agua como disolvente, ya que la liberación de algunos compuestos puede provocar un incremento de la viscosidad. En este aspecto la enzima también tiene un papel importante, ya que es capaz de degradar algunos de estos compuestos, reduciendo la viscosidad y permitiendo así unas mejores condiciones de trabajo para los ultrasonidos (45).

Estudios realizados en 2014 con salvado de trigo en los que se aplicaron métodos conjuntos con ultrasonidos y tratamiento enzimático para la extracción de polisacáridos se obtuvieron buenos rendimientos de extracción, siendo hasta un 14% superiores que al aplicarlos por separado. Las condiciones de trabajo empleadas fueron 70 minutos de exposición a una 50°C, con potencia de 180 W y con una concentración de enzima (mezcla de xilanas, amilasa, proteasa y amiloglicosidasa) de 4.5 g/L (45).

Estudios realizados en el año 2020 demostraron que los ultrasonidos mejoran la capacidad de las enzimas para la extracción de compuestos fenólicos, pigmentos, lípidos y polisacáridos de diversas plantas y semillas (46).

#### Hidrólisis enzimática asistida por microondas (MAEE)

La MAEE se emplea para facilitar la extracción de compuestos bioactivos, ya que la radiación de microondas produce un calentamiento rápido del disolvente que aumenta la permeabilidad de la membrana y la pared celular, permitiendo una mejor transferencia de los macrocomponentes del interior celular al disolvente. La enzima puede añadirse tanto antes como después del tratamiento por microondas. En caso de añadirse con posterioridad, es imprescindible dejar un periodo de enfriamiento de las muestras para que la temperatura del medio no inactive a la enzima. La MAEE puede utilizarse como una alternativa a la extracción convencional con disolventes orgánicos (45).

El grupo de investigación dirigido por Zhang en 2018 (47) hizo un estudio comparativo de las capacidades de extracción de polifenoles sobre muestras de restos de cáscaras de cacahuate cuando se utilizaron métodos de extracción por MAEE o por UAE o hidrólisis enzimática por separado. Las condiciones de trabajo utilizadas para la extracción con MAEE fueron la utilización de la enzima celulasa al 0.81% a un pH de 5.5 durante 2 horas y a una temperatura de 66°C, con un tiempo de irradiación de 2.6 minutos. Los resultados concluyeron que los rendimientos conseguidos con MAEE eran superiores a los conseguidos con los métodos por separado (1.75% frente a 1.56% y 1.62%, respectivamente), aunque muy bajos en todos los casos (45).

No obstante, este método de extracción se descartó por las mismas razones que las ya expuestas para el MAE. El aparato no estaba disponible para ser utilizado y, además, estudios realizados con anterioridad por miembros del grupo de investigación indicaban que la extracción por MAEE no aporta buenos resultados en esta biomasa. La solubilización de las proteínas no mejoró y el tamaño de los péptidos obtenidos fue mucho menor al conseguido cuando se aplicó UAE; en el caso de los carbohidratos, tan sólo la de la xilosa aumentó, pero en todos los casos las recuperaciones fueron muy bajas y se generaban muchas pérdidas. Se dedujo que la radiación del equipo de microondas había afectado negativamente a las enzimas, reduciendo su efectividad (41).

## 1.4. Justificación de los métodos de extracción escogidos

En este apartado se explica de manera clara y concisa las razones por las que cada uno de los métodos de extracción de los macrocomponentes contenidos en la biomasa microalgal fue elegido, atendiendo siempre a los datos recogidos con la bibliografía.

- 1) Estudios previos del grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo este trabajo (41) demostraron que en medio ácido se consiguen los mejores resultados para la extracción de aminoácidos, por lo que será importante realizar experimentos a este pH. Se decidió además realizar este tratamiento a dos temperaturas diferentes: los mejores rendimientos de extracción se consiguieron a 120°C, mientras que a 60°C lo que se deseaba era minimizar la degradación producida sobre los macrocomponentes.
- 2) Este mismo grupo observó también que las solubilizaciones de carbohidratos eran mayores cuando se empleaban métodos de extracción por hidrólisis alcalina, por eso se decidió aplicarlo en este trabajo. De nuevo, se utilizarán dos temperaturas: 120°C para conseguir los mejores rendimientos de solubilización y 60°C para reducir las posibilidades de degradación de los compuestos (41).
- 3) Se decidió realizar experimentos de hidrólisis enzimática con el fin de conocer el efecto que ejercían dos tipos de enzima diferentes sobre la extracción de proteínas y carbohidratos: enzima Protamex™ por favorecer la extracción de proteínas del interior de las células microalgales y romper sus enlaces para obtener péptidos (24); y enzima Celluclast™ que es capaz de romper la pared celular de la microalga mediante la degradación de los polisacáridos que la conforman, de tal manera que los macrocomponentes de su interior quedan liberados al disolvente de extracción (22).
- 4) Existen evidencias previas de que los tratamientos con ultrasonidos sobre muestras de biomasa algal mejora la inserción del disolvente en las células y la ruptura de la pared celular, además de ser un método sencillo para conseguir extraer proteínas y carbohidratos, por lo que se decidió utilizar este método de extracción. La capacidad de extracción de los ultrasonidos mejoraba con el tiempo, obteniendo el máximo al emplear tiempos de exposición de 1 hora (41).
- 5) Por último, se decidió llevar a cabo también tratamientos de extracción por ultrasonidos combinados con hidrólisis enzimática con las dos enzimas ya mencionadas, ya que estudios previos del grupo de investigación donde se realizó este trabajo demostraban que estos métodos conseguían mejores resultados que los métodos por separado (41).

## 2. OBJETIVOS, PLAN DE TRABAJO Y JUSTIFICACIÓN

---

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster es hacer un estudio de la influencia de los contaminantes emergentes y los metales pesados en la valorización de biomasa algal crecida en purines mediante diferentes tipos de tratamiento para la obtención de péptidos y monosacáridos. Así mismo, se estudia la influencia de estos fármacos veterinarios y metales pesados en la composición bioquímica de la microalga.

Para ello, se analizan tres tipos de biomasa: una crecida en el fotobiorreactor alimentado por purines de cerdo diluido sin dopar, una segunda en la que el purín de cerdo está dopado con fármacos veterinarios y una última dopada con metales pesados. Se utilizaron biomاسas formadas por un consorcio de microalgas (*Scenedesmus almeriensis*) y bacterias crecidas en un fotobiorreactor de 1200 L de capa fina, las cuales han sido cedidas al Instituto de Procesos Sostenibles (ISP) por la Universidad de Almería (UAL).

En concreto, los objetivos específicos son los siguientes:

- a) Determinar las posibles diferencias de composición que existan entre la composición bioquímica de la biomasa microalgal que ha sido crecida en el fotobiorreactor alimentada únicamente con purín de cerdo diluido al 10% y las biomاسas crecidas en el mismo fotobiorreactor alimentado con purín de cerdo diluido al 10% dopado con fármacos veterinarios o con metales pesados.
- b) Evaluar el efecto de la presencia de fármacos veterinarios y de metales pesados en los rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos, además de su recuperación en forma de péptidos y monosacáridos, respectivamente, aplicando la técnica de ruptura celular por exposición a ultrasonidos durante una hora.
- c) Evaluar el efecto de la presencia de fármacos veterinarios y de metales pesados en los rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos, además de su recuperación en forma de péptidos y monosacáridos, respectivamente, aplicando la técnica de ruptura celular de ultrasonidos asistido por hidrólisis enzimática con Protamex™ y Celluclast™ 1.5L.
- d) Evaluar el efecto de la presencia de fármacos veterinarios y de metales pesados en los rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos, además de su recuperación en forma de péptidos y monosacáridos, respectivamente, aplicando la técnica de ruptura celular de hidrólisis alcalina a 120 y 60°C.
- e) Evaluar el efecto de la presencia de fármacos veterinarios y de metales pesados en los rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos, además de su recuperación en forma de péptidos y monosacáridos, respectivamente, aplicando la técnica de ruptura celular de hidrólisis ácida a 120 y 60°C.
- f) Evaluar el efecto de la presencia de fármacos veterinarios y de metales pesados en los rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos, además de su recuperación en forma de péptidos y monosacáridos, respectivamente, aplicando la técnica de ruptura celular de hidrólisis enzimática con Protamex™ y Celluclast™ 1.5L.
- g) Determinar la distribución de metales pesados y arsénico entre el sólido residual y el hidrolizado en cada tratamiento aplicado a la biomasa.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Biomasa utilizada como materia prima

La biomasa utilizada para este estudio es un consorcio de microalgas y bacterias formada por microalga la especie *Scenedesmus almeriensis*. La biomasa fue cultivada en un fotobiorreactor de capa fina de 1200 L durante periodos de 37 días y alimentado por un efluente de purín de cerdo diluido al 10% con agua. Se realizaron dos ensayos independientes en el fotobiorreactor en los que el efluente va a ser dopado con dos tipos de contaminantes: el primero con tres de los fármacos veterinarios más utilizados (sulfadiazina, tetraciclina y ciprofloxacina) en concentraciones de traza como puede verse en la *Tabla 5* y el segundo con tres metales pesados (Cu, Zn y As) en las concentraciones indicadas en la *Tabla 6*. Las concentraciones en las que se han dispuesto estos compuestos dopantes están directamente relacionadas con las cantidades en las que suelen presentar en este tipo de efluente según estudios previos (29,30,31).

Compuesto veterinario	Concentración (µg/L)
Sulfadiazina (SDZ)	100
Tetraciclina (TET)	100
Ciprofloxacino (CIP)	100

**Tabla 4.** Fármacos veterinarios que se han utilizado en el dopaje del efluente del fotobiorreactor y concentraciones en la que se han añadido.

Metal	Compuesto de dopaje	Concentración (mg/L)
Cu	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5
Zn	$\text{ZnCl}_2$	15
As	$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1

**Tabla 5.** Metales pesados empleados como dopaje del efluente del fotobiorreactor, forma química en la que se presentan y concentración a la que se han añadido.

Cada ensayo de tratamiento de purines con el consorcio de microalgas y bacterias consta de tres etapas:

- 1) Del día 1 al 15 del ensayo, se alimenta cada día el fotobiorreactor con purín al 10% sin dopar con un tiempo de retención hidráulico de 5 días. En los días 12 y 15 de esta etapa se recoge una cierta cantidad de biomasa seca, en dos intervalos de tiempo espaciados unas horas. Estas muestras se liofilizan y son las que se toman como referencia de biomasa sin dopar (SD).
- 2) Del día 16 al 36, se procede a alimentar con el mismo efluente, pero dopado (con contaminantes emergentes en el ensayo 1 y con metales pesados en el ensayo 2). En los días 30, 33 y 35 se recogió una cierta cantidad de biomasa seca, en dos intervalos de tiempo espaciados unas horas. Estas muestras se liofilizaron y son las que se toman como referencia de biomasa dopada (D).
- 3) El día 37 del experimento se destina al vaciado del reactor y a su limpieza para poder comenzar el siguiente ensayo.

#### 3.2. Métodos analíticos

A lo largo de este apartado se van a explicar detalladamente los procedimientos experimentales de cada una de las técnicas analíticas aplicadas para la determinación de los componentes principales de la biomasa algal (carbohidratos, lípidos, proteínas y sólidos), así como el método aplicado para la cuantificación los metales pesados. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

### 3.2.1. Determinación de sólidos totales y sólidos volátiles

La determinación de sólidos totales y cenizas de las muestras se realizó por gravimetría. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Se pesó el crisol vacío y también con una cucharada de biomasa algal liofilizada (300-400 mg aproximadamente), de tal manera que la masa de biomasa se obtuvo por diferencia.
- 2) Se introdujo durante 24 horas en la estufa a 105°C y después se pesó de nuevo el crisol con la muestra. El porcentaje de sólidos totales se obtiene a partir de la siguiente:

$$\% \text{Sólidos totales (w/w)} = \frac{m_{\text{crisol con muestra (g)}} - m_{\text{crisol estufa (g)}}}{m_{\text{biomasa algal (g)}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación VI}$$

- 3) Por último, se dejó en la mufla a 550°C durante otras 24 horas y después se volvió a pesar el crisol con la muestra. El porcentaje de sólidos volátiles se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Sólidos volátiles (w/w)} = \frac{m_{\text{crisol con muestra (g)}} - m_{\text{crisol mufla (g)}}}{m_{\text{biomasa algal (g)}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación VII}$$

### 3.2.2. Determinación de lípidos

Para el análisis de la composición de lípidos de la biomasa se utilizó un método gravimétrico basado en una extracción con solventes orgánicos, en este caso una mezcla cloroformo metanol (muy utilizada en este tipo de biomasa). Los pasos para la determinación de lípidos en las muestras sólidas de biomasa algal fueron los siguientes (48):

- 1) Sobre un Erlenmeyer de 50 mL se pesaron 100 mg de biomasa y 100 mg de alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), previamente desecada para eliminar la humedad.
- 2) Se añadieron 20 mL de una disolución de  $\text{CHCl}_3$  - MeOH 2:1 (v/v) y se tapa con papel de aluminio, procurando cerrarlo bien para que no se evapore el disolvente.
- 3) A continuación, se introdujeron en la incubadora a 60 °C durante 1 h con agitación constante de 150 rpm.
- 4) Una vez transcurrido este tiempo, se traspasó la disolución a un falcon de 50 mL sin faldón y se añadieron 5 mL de una disolución HCl 0.1 M. Se agitó en vórtex durante 1 minuto y después se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm.
- 5) Se añadió 1 mL de disolución acuosa de  $\text{MgCl}_2$  al 0.5% para separar las proteínas. Se agitó en el vórtex 1 minuto y se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior. Después del proceso, se observó en el falcon la precipitación de las proteínas en la interfase, la sedimentación de la alúmina en el fondo y dos fases líquidas: una clara en la parte superior y otra orgánica más oscura en la que se encuentran los lípidos extraídos.
- 6) Con ayuda de una micropipeta se recogió la fase orgánica en la que están disueltos los lípidos (de color oscuro) sobre un vial de vidrio previamente secado en el horno a 40 °C y pesado. Se introdujo en el horno a baja temperatura durante toda la noche con el fin de evaporar el disolvente y después se pesa el vial.

El porcentaje de lípidos que contiene la muestra se obtuvo aplicando la siguiente ecuación I:

$$\% \text{ lípidos (w/w)} = \frac{m_{\text{vial con muestra (g)}} - m_{\text{vial vacío (g)}}}{m_{\text{biomasa algal (g)}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación I}$$

### 3.2.3. Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas en las muestras, se realizó un análisis de nitrógeno orgánico total mediante el método Kjeldahl (que también se utilizó para la comprobación del balance de materia de nitrógeno), el cual es un procedimiento que constó de varias etapas (49).

- 1) En primer lugar, se realizó una digestión a la muestra. Se depositó la muestra en tubos de digestión junto con un agitador cilíndrico, una pastilla de catalizador Kjeldahl (0.5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.2% Se) y, por último, 6 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado al 98%. A continuación, se comenzó el proceso de digestión a 370°C durante 1 hora. Para las fases sólidas, se pesaron 100 mg de biomasa algal liofilizada, mientras que para las muestras líquidas se emplearon 1.5 mL de la suspensión. En el caso de la biomasa de las fases sólidas, ésta debe estar envuelta en papel de fumar con el fin de que no se carbonice. Es importante vigilar que no se formen espumas negras dentro de los tubos de digestión, ya que habría que detener el proceso.
- 2) Tras la digestión, se dejaron enfriar los tubos y se limpió el colector de humos para eliminar los restos de ácido sulfúrico que pudieron quedar.
- 3) Después, se realizó la destilación y la neutralización del  $\text{H}_2\text{SO}_4$  con NaOH en el destilador Buchi (KjeFlex K-360). La fase líquida resultante fue recogida sobre un Erlenmeyer al que previamente el propio sistema había añadido una disolución de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Los indicadores colorimétricos utilizados para la valoración son rojo de metilo y azul de metileno, ya incluidos en la disolución de ácido bórico.
- 4) Finalmente se llevó a cabo la valoración de la fase líquida con una disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M ó 0.05 M. Se valoró hasta el punto final del viraje, dónde la disolución cambia de color verde a morado brillante.

El porcentaje de nitrógeno y proteína se calcula aplicando las siguientes ecuaciones (II, III, IV y V). Es necesario calcular primero el porcentaje de nitrógeno y, multiplicando por un factor de conversión, se obtienen la cantidad de proteína presente en la muestra.

- 1) Fases sólidas:

$$\%N (w/w) = \frac{C_{\text{H}_2\text{SO}_4} (M) \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4} (mL)}{m_{\text{biomasa algal}} (g)} \cdot 1.4 \quad \text{Ecuación II}$$

$$\%Proteínas \left( \frac{w}{w} \right) = \%N \cdot \text{factor } N - P \quad \text{Ecuación III}$$

- 2) Fases líquidas:

$$C_N (ppm) = \frac{C_{\text{H}_2\text{SO}_4} (M) \cdot V_{\text{muestra biomasa}} (mL)}{V_{\text{H}_2\text{SO}_4} (mL)} \cdot 14000 \quad \text{Ecuación IV}$$

$$C_{\text{Proteínas}} (ppm) = C_N (ppm) \cdot \text{factor } N - P \quad \text{Ecuación V}$$

Los factores N-P se obtuvieron relacionando la cantidad total de aminoácidos de las muestras con respecto a las concentraciones de nitrógeno orgánico total obtenidas por el análisis de NKT. Se necesita conocer por separado el factor de las muestras dopadas con fármacos veterinarios y las dopadas con metales pesados, determinando para cada una el factor N-P tanto de las muestras dopadas como de las sin dopar. El estudio del perfil de aminoácidos ha sido realizado mediante cromatografía por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. Según sus protocolos internos, hidrolizando las muestras en medio ácido con HCl y analizando con una columna Zorbax Eclipse Plus C18 con un detector de UV en modo de gradiente con flujo de 1.5 mL/min.

Factor N-P		
Biomasa sin dopar	Biomasa dopada	
3.90	4.54	<b>Ensayo 1 (con CES)</b>
4.15	4.09	<b>Ensayo 2 (con metales)</b>

Tabla 6. Datos de los factores N-P calculados para cada una de las muestras tratadas.

### 3.2.4. Determinación de carbohidratos

El contenido de carbohidratos de las muestras se determinó como monosacáridos totales utilizando un procedimiento del NREL descrito en 2019 por Martín-Juárez et al. (24) que consiste en la hidrólisis ácida de los carbohidratos presente en la biomasa y posterior cuantificación de los monosacáridos generados mediante HPLC (Shimadzu LC-2050). Se cuantificará la concentración de los principales monosacáridos presentes en este tipo de biomasa: glucosa, arabinosa, xilosa y celobiosa. Los pasos a seguir con las fases sólidas fueron los siguientes (50):

- 1) Se pesaron 300 mg de biomasa algal liofilizada sobre tubos de vidrio altos y se añadieron 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 72% (w/w). Se cubrió la boca con papel de aluminio.
- 2) Se metieron en un baño termostático a 30°C durante una hora. Fue necesario agitar los tubos de vidrio cada 10-15 minutos durante el proceso con el fin de favorecer la solubilización.
- 3) Se trasvasó el líquido a un vaso de cristal de borosilicato de 100 mL para reducir la concentración del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 4% añadiendo 84 mL de agua MilliQ.
- 4) Se introdujeron en el autoclave los vasos de vidrio durante 1 hora a 121°C. Los vasos deben estar con la tapa puesta pero no cerrada por completo, para evitar sobrepresión.
- 5) Transcurrido este tiempo, se sacaron los vasos del autoclave y se dejaron enfriar. El sobrenadante se filtra por filtros de 0.22 µm (para evitar posibles sólidos) y se añadieron a viales de vidrio de HPLC de 1.5 mL.

Además, antes de introducir las fases líquidas en los viales de vidrio de HPLC de 1.5 mL es necesario filtrarlas por filtros de 0.22 µm con ayuda de una jeringa de plástico.

### 3.2.5. Determinación de metales

La determinación del contenido de metales se realizó por espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inducido (ICP Agilent 7800-OES Varían 725). Sin embargo, el ISP no dispone de este sistema, por lo que las muestras son trasladadas a las instalaciones del LTI. Las muestras líquidas se analizan sin ningún pretratamiento, tan sólo añadiendo unos 20 mL de muestra sobre un falcon de 50 mL filtrados por 0.45 µm. Las muestras sólidas necesitan una digestión previa por microondas (Milestone ETHOS PLUS Microwave). Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- 1) Se pesaron 50 mg de muestra sobre los tubos de teflón propios del sistema de microondas y se añadieron 10 mL de HNO<sub>3</sub> al 69%. Tener en cuenta que en las muestras del segundo ensayo (metales pesados) quedaron restos de arena de la calima sin digerir.
- 2) Se montó el sistema de microondas y se sellaron bien los tubos, iniciándose a continuación el proceso de digestión. El primer paso es una rampa térmica de 10 minutos para ascender 20°C hasta 180°C y, seguidamente, se mantiene esta temperatura durante otros 10 minutos.
- 3) Se dejó enfriar el microondas y se retiraron los tubos del soporte del microondas dentro de la campana de extracción y con cuidado, ya que en este proceso se libran gases tóxicos de nitrógeno.
- 4) Una vez se ha liberado todo el gas, se lavaron la tapa y las paredes del tubo de teflón con agua desionizada para recoger los metales que hayan podido quedarse ahí depositados.

- 5) Se trasvasó la disolución a un tubo falcon previamente tarado y se enrasó con agua desionizada hasta conseguir 30 g de disolución. Es necesario filtrar la disolución por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  antes de pasarlo al falcon.

El departamento del LTI aporta directamente las concentraciones de los metales de las muestras, en unidades de mg/L. En el caso de las muestras sólidas, para conocer la concentración real es necesario hacer un cálculo matemático que viene dado por la *Ecuación VIII*:

$$C_{\text{metales en muestra}} = \frac{C_{\text{metal}} (\text{mg/L}) \cdot m_{\text{falcon+disolución muestra}} (\text{g})}{m_{\text{biomasa pesada inicial}} (\text{g})} \quad \text{Ecuación VIII}$$

### 3.2.6. Determinación de carbono orgánico total (TOC)

En el ensayo con dopaje de metales pesados los resultados sobre el contenido de carbohidratos de las muestras no fueron concluyentes, ya que se detectaron pérdidas elevadas, pero en el cromatograma no aparecían señales correspondientes a los compuestos de degradación habituales (ácido acético, ácido fórmico, metanol, etanol, etc). Con el fin de saber si había tenido lugar algún tipo de degradación de los carbohidratos a compuestos orgánicos más simples y no detectables con esta técnica, se decidió llevar a cabo un análisis de carbono orgánico total (*Total Organic Carbon*, TOC) de las fases líquidas resultantes de cada experimento (Shimadzu Total Organic Carbon Analyzer TOC-L). Este procedimiento constó de los siguientes pasos:

- 1) Se preparan viales de vidrio de 20 mL de cada una de las muestras líquidas a analizar, filtrando previamente por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se cierran los viales con una tapa con septum.
- 2) Se preparan también muestras de un blanco de agua tipo MilliQ, de un patrón de 500 ppm de carbono orgánico (disolución acuosa de ftalato de potasio), otro de 500 ppm de carbono inorgánico (disolución acuosa de carbonato de sodio) y finalmente un patrón de 500 ppm para la determinación de nitrógeno total (nitrato de potasio). Las muestras de patrones están previamente filtradas por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se cierran los viales con una tapa con septum.
- 3) Se depositan los viales cerrados en el carrusel del equipo, poniendo en primer lugar el blanco y los patrones, seguidos de las muestras.

Las concentraciones de TOC se calcularon aplicando la siguiente *Ecuación IX*:

$$C_{\text{TOC real}} (\text{mg/L}) = C_{\text{TOC muestra}} (\text{mg/L}) - C_{\text{TOC blanco}} (\text{mg/L}) \quad \text{Ecuación IX}$$

### 3.2.7. Cálculo de solubilización y recuperación

Con el fin de conocer la eficacia de cada uno de los tratamientos realizados sobre la biomasa, se calcularon los rendimientos de solubilización y recuperación de cada componente. La solubilización se calculó sobre las muestras en fase sólida (FS) obtenidas después de llevar a cabo el experimento y la solubilización sobre las fases líquidas (FL) obtenidas de la misma forma. Las ecuaciones para el cálculo de estos parámetros son las siguientes:

$$\% \text{ Solubilización} = \left( 1 - \left( \frac{m_s \cdot S_i}{m_o \cdot X_i} \right) \right) \cdot 100 \quad \text{Ecuación X}$$

$$\% \text{ Recuperación} = \left( \frac{m_l \cdot L_i}{m_o \cdot X_i} \right) \cdot 100 \quad \text{Ecuación XI}$$

Donde  $m_s$  es la masa de la fracción sólida después de la hidrólisis (en gramos),  $S_i$  es la fracción en masa de cada componente en la fracción sólida después de la hidrólisis (%),  $m_o$  es la masa inicial de biomasa (g) y  $X_i$  es la fracción en masa de cada componente en la biomasa inicial (%),  $m_l$  es la masa de la fracción líquida

después de la hidrólisis (en gramos) y  $L_i$  es la fracción en masa de cada componente en la fracción líquida después de la hidrólisis (%).

### 3.3. Experimentos realizados

Con el fin de estudiar los diferentes comportamientos de la muestra de biomasa algal con respecto al tipo de hidrólisis que se le aplique, se realizaron varios tratamientos diferentes a cada tipo de biomasa, utilizando una suspensión al 5% (w/w) en todos ellos, siguiendo las mismas condiciones que se las indicadas en la bibliografía previa (22,40). Posteriormente, se realizó el análisis del contenido de lípidos, carbohidratos, proteínas y sólidos en cada una de las fases obtenidas (fase líquida y fase sólida). Estos experimentos se realizaron sobre todos los tipos de muestra: la biomasa algal sin dopar, la dopada con fármacos veterinarios y la dopada con metales. A continuación, la *Tabla 7* engloba todos los experimentos que se van a realizar y el código con el que nos referiremos a ellos a lo largo del estudio. Seguidamente, se explicarán con detalle los procedimientos de cada uno.

Se recibieron cinco grupos de muestras de cada ensayo separados en función del día en que se recogieron las muestras del fotobiorreactor: dos de biomasa sin dopar y tres de biomasa dopada con fármacos veterinarios o metales pesados, en cada caso. Para el primer ensayo (fármacos veterinarios), la cantidad de muestra dopada no era suficiente como para realizar todos los experimentos sobre cada una de ellas, por lo que tras un previo análisis para determinar que la composición no varía significativamente entre cada día, se mezclaron las tres muestras de biomasa dopada. Este mismo análisis previo se hizo sobre las muestras de biomasa del segundo ensayo (metales pesados), llegando a la misma conclusión. Pero, en este caso, dado que había biomasa suficiente, los experimentos se realizaron sobre las muestras de los días de los que había más cantidad de biomasa, siendo el día 12 para la biomasa sin dopar y el día 33 para la dopada con metales. Por cada experimento se realizó una hidrólisis, analizando las fases líquidas y sólidas resultantes por duplicado y calculando los errores como desviación estándar (%SD).

Experimento	Código
UAE	UAE
UAEE (Protamex)	UAEE-P
UAEE (Celluclast)	UAEE-C
Hidrólisis enzimática (Protamex)	HE-P
Hidrólisis enzimática (Celluclast)	HE-C
Hidrólisis química en medio básico a 120 °C	NaOH-120
Hidrólisis química en medio ácido a 120 °C	HCl-120
Hidrólisis química en medio básico a 60 °C	NaOH-60
Hidrólisis química en medio ácido a 60 °C	HCl-60

**Tabla 7.** Resumen de los experimentos a realizar sobre las muestras de biomasa algal y los correspondientes códigos de identificación.

#### 3.3.1. UAE (Ultrasound Assisted Extraction)

Se pesaron 5 g de biomasa algal seca a un vaso de precipitados de 200 mL y se vertió agua MilliQ hasta llegar a los 100 g (para obtener así una suspensión al 5% (w/w)). Se agitó con agitador magnético para que se disolviera y luego se midió el pH final de la suspensión.

Posteriormente, se vertió la suspensión en el reactor con encamisado de vidrio (que mantendrá la temperatura constante a 50°C) del equipo de ultrasonidos (UA) y se sumergió la sonda en su interior. La sonda de ultrasonidos empleada fue el modelo UIP1000hd (1000 W, 20 kHz, Hielscher Ultrasound Technology, Germany). Se conectó el equipo y se mantuvo en funcionamiento durante una hora, con una amplitud constante del 50%. Análisis hecho previamente en el laboratorio revelaron que una mayor amplitud no mejora el rendimiento de extracción, al igual que si se incrementa el tiempo de exposición más de una

hora. Además, si se superara la hora de exposición a los ultrasonidos podrían producirse fenómenos de degradación.

Tras acabar el tiempo de tratamiento por UAE, se trasvasó la suspensión obtenida a un bote de plástico con tapa y se centrifugó (Legend RT+Thermo Scientific, USA) a 10000 rpm durante 10 minutos para separar ambas fases. La fase líquida se pasó a un recipiente de plástico de tapa roja previamente tarado y la fase sólida a otro recipiente para su posterior liofilización. El equipo de centrifuga utilizado se estropeó y se tuvo que pasar a utilizar el equipo Fisher Bioblock scientific 2-16P, que es más pequeño y se tuvo que trabajar a 7800 rpm durante 12 minutos para conseguir una correcta separación de las fases.

Según estudios previos (41), hay evidencias de que el tratamiento de la muestra con UA provoca una acción mecánica adicional que mejora los fenómenos de inserción del disolvente en las células, la ruptura de la pared celular o los fenómenos de transferencia de masa. Como consecuencia, se trata de un tratamiento muy útil para las muestras de origen vegetal (biomasa algal) protagonistas de este estudio para la extracción y recuperación de compuestos como proteínas o carbohidratos.

Estudios realizados anteriormente por la Universidad de Valladolid consiguen buenos rendimientos de extracción aplicando ultrasonidos durante periodos de 1 hora (41), por lo que ese fue el tiempo de trabajo empleado en los experimentos.

### 3.3.2. Hidrólisis enzimática

La preparación de la muestra es exactamente el mismo que el descrito en el apartado 3.3.1. (suspensión al 5%), pero con la diferencia de que se añaden una cantidad determinada de enzima a la suspensión acuosa de la biomasa. A esta suspensión se le adicionó enzima Protamex™ con una concentración de 1:100 w/w o enzima Celluclast™ con una concentración de 10 FPU/g carbohidrato, tales dosis fueron las que la bibliografía sobre la optimización del proceso indicaba (22). Es importante cerciorarse de que el pH de la suspensión se encuentra dentro del rango de trabajo del enzima. El intervalo de tiempo que pase entre la adición de la enzima y la introducción en el equipo de incubación debe ser lo más corto para que no se den procesos de solubilización no controlada (51).

Este experimento se llevó a cabo con dos tipos de enzima diferentes: Protamex™ y Celluclast™. La enzima Protamex™ está compuesta por una mezcla de serino y metalo proteasas que son generadas por la bacteria *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. Presenta una actividad enzimática de 1.7 UAg<sup>-1</sup> y una densidad de 1100 kgm<sup>-1</sup>. Sus condiciones óptimas de trabajo son entre los 35 y los 60 °C y un pH próximo a 6.5 (26). Por el contrario, se inactiva si la temperatura llega a los 85 °C durante, al menos, 10 minutos (52). Esta enzima permite extraer de forma eficaz las proteínas del interior de las células microalgales, romper los enlaces que las unen y obtener péptidos de tamaño elevado, además de permitir obtener aminoácidos (22), por lo que resulta ser muy útil para este estudio. En cuanto a la enzima Celluclast™, la conforman un conjunto de enzimas celulolíticas, entre las que destacan las enzimas celobiohidrolasas y las endo-1,4-beta-glucanasas. La procedencia de estas enzimas es el hongo *Trichoderma reesei*, que los secreta en grandes cantidades (53). La enzima Celluclast™ se utiliza mayoritariamente para realizar hidrólisis sobre muestras de biomasa lignocelulósicas ya que reacciona y rompe polisacáridos. Las condiciones óptimas de trabajo del Celluclast™ se encuentran entre los 41 y los 50°C y su pH óptimo de trabajo es 4.8 (22). Esta enzima permite romper eficazmente la pared celular de la microalga, degradando los polisacáridos que la conforman como componente mayoritario, de tal manera que los compuestos internos queden liberados, siendo una enzima de gran interés para el fin de esta investigación (24).

Una vez la enzima estaba adicionada a la suspensión de biomasa, de forma inmediata se introdujo en la incubadora a 50 °C durante 1 hora con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se trasvasó la

suspensión a un bote de plástico con tapa y se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm para separar ambas fases. La fase líquida resultante se llevó a un recipiente de plástico de tapa roja previamente tarado y la fase sólida a otro recipiente de tapa roja para su posterior liofilización.

Por lo tanto, para estos experimentos las condiciones de operación fueron de 50°C, un tiempo de hidrólisis de 1 hora y un pH de 6.5 para los ensayos con la enzima Protamex™ (concentración 1:100 w/w<sub>biomasa seca</sub>) y 4.8 para la enzima Celluclast™ (concentración de 10 FPU/g carbohidrato). Estos valores se basan en resultados previos de optimización realizados por el grupo en el que se ha realizado este trabajo (22). La razón por la cual la hidrólisis enzimática se mantiene durante una hora es porque, según estudios realizados anteriormente, se ha observado que las curvas de hidrólisis de la enzima van creciendo hasta llegar al equilibrio a los 60 minutos, aproximadamente (51).

### 3.3.3. UAEE (Ultrasound Assisted Extraction + Enzima)

La UAEE se llevó a cabo aplicando las mismas condiciones operativas que las descritas para los experimentos de hidrólisis enzimática y el tratamiento por ultrasonidos, con una amplitud del 50% y durante 1 hora. Los experimentos se realizaron con enzima Protamex™ (concentración 1:100 w/w<sub>biomasa seca</sub>) a un pH de 6.5 y con enzima Celluclast™ (concentración de 10 FPU/g carbohidrato) a un pH de 4.8, sobre un recipiente encamisado que permitía controlar la temperatura y mantenerla constante a 50°C.

Tras acabar el tiempo de tratamiento por UAEE, se trasvasó la suspensión obtenida a un bote de plástico con tapa y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min (UIP1000hd 1000 W, 20 kHz, Hielscher Ultrasound Technology, Germany) para separar ambas fases. La fase líquida se pasó a un recipiente de plástico de tapa roja previamente tarado y la fase sólida a otro recipiente para su posterior liofilización.

### 3.3.4. Hidrólisis química en medio básico

Se pesaron 5 g de biomasa algal seca sobre un vaso de precipitados y, en este caso, en lugar de enrasar con agua hasta los 100 g, se añadió una disolución de NaOH 2M. Esta concentración fue la que mejores rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos generó, sobre todo en el caso de las proteínas (40,43). Estudios previos realizados en el ISP (41) indicaron que la solubilización de proteínas en medio NaOH 2M a 120°C fue del 88%, mientras que a 60°C descendió al 54% y al 36% a 40°C. Por eso, las temperaturas de trabajo escogidas para este ensayo fueron 120 y 60°C. El procedimiento experimental a llevar a cabo varía en función de la temperatura de trabajo empleada.

#### *Tratamiento a 60°C*

La suspensión se introdujo en la incubadora a 60°C durante una hora y con agitación constante. Mayores tiempos de trabajo podrían dar lugar a procesos de degradación, los trabajos previos realizados por el grupo de investigación concluyen que estas condiciones son las que aportan mejores rendimientos (39). La finalidad de la utilización de esta temperatura de trabajo es reducir la posible degradación de los productos de la extracción (22).

#### *Tratamiento a 120°C*

La suspensión se trasladó a un bote de vidrio de tapa azul y se introdujo en el autoclave durante 1 hora a 121°C y con presión de 1 bar. Los botes no deben estar completamente cerrados, sino que la tapa debe presentar algo de holgura con el fin de evitar que se genere sobrepresión. Una vez finalizado el proceso, se trasvasó la suspensión resultante a un bote de plástico con tapa para centrifugarlo a 10000 rpm durante 10 min para separar ambas fases. La fase líquida se pasó a un recipiente de plástico de tapa roja previamente tarado y la fase sólida a otro para su posterior liofilización.



La finalidad del empleo de esta temperatura es obtener unos rendimientos de solubilización lo más altos posible (22).

### 3.3.5. Hidrólisis química en medio ácido

El procedimiento es exactamente el mismo que el explicado en el apartado 3.3.4., pero utilizando una suspensión de biomasa seca al 5% con una disolución de HCl 2M. También se hacen dos tratamientos a diferentes temperaturas: a 60 y a 120°C con los mismos objetivos que en el caso del medio básico y escogiendo ambas temperaturas por las mismas razones (23). Estudios previos consiguieron solubilizar el 87% de los carbohidratos en medio HCl 2M a 120°C y el 65% a 60°C (41).

## 3.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y el estudio de los fármacos veterinarios y los metales pesados en los resultados, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Esta prueba permitió evaluar la existencia de diferencias significativas entre los rendimientos medios con un nivel de significación del 5% ( $p < 0.05$ ). Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimentos analizados en réplica). Los datos se analizaron con el software Excel.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se muestran los resultados experimentales obtenidos durante la determinación de la composición bioquímica de los cuatro tipos de muestras de biomasa microalgal tratadas en este estudio aplicando los métodos analíticos explicados en el apartado 3.2. Estos tipos son la biomasa sin ningún tipo de dopaje (control), la biomasa algal dopada con fármacos veterinarios y, por último, la biomasa algal dopada con metales pesados.

También se determinarán y estudiarán con detalle los rendimientos de solubilización y recuperación de los macrocomponentes principales (proteínas y carbohidratos) con el fin de conocer la eficiencia de cada tratamiento y el efecto que puedan tener los fármacos y los metales pesados. Para que los resultados obtenidos fueran comparables entre los diferentes experimentos a tratar, se decidió realizar los cálculos de las composiciones en base seca, es decir, teniendo en cuenta el porcentaje de humedad que tiene la biomasa.

### 4.1. Influencia de los fármacos en la composición de la biomasa

En primer lugar, se realizó un estudio comparativo de las biomazas microalgales sin dopar (SD) y las dopadas (D) con fármacos veterinarios para comprobar si existe algún tipo de similitud o diferencia entre las composiciones bioquímicas de ambas (sólidos, cenizas, proteínas, carbohidratos y lípidos). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente *Tabla 8*.

	Biomasa SD	Biomasa D
<b>Cenizas (%)</b>	4.03 ± 0.45 <sup>a</sup>	3.58 ± 0.77 <sup>a</sup>
<b>Proteínas (%)</b>	35.57 ± 0.53 <sup>a</sup>	38.95 ± 0.29 <sup>a</sup>
<b>Carbohidratos (%)</b>	33.43 ± 1.66 <sup>a</sup>	29.84 ± 1.29 <sup>b</sup>
<b>Glucosa (%)</b>	23.50 ± 1.26 <sup>a</sup>	18.08 ± 0.86 <sup>b</sup>
<b>Xilosa (%)</b>	8.94 ± 0.39 <sup>a</sup>	10.37 ± 0.43 <sup>b</sup>
<b>Lípidos (%)</b>	15.74 ± 0.81 <sup>a</sup>	14.19 ± 0.43 <sup>a</sup>
<b>Factor N-P</b>	3.90	4.54

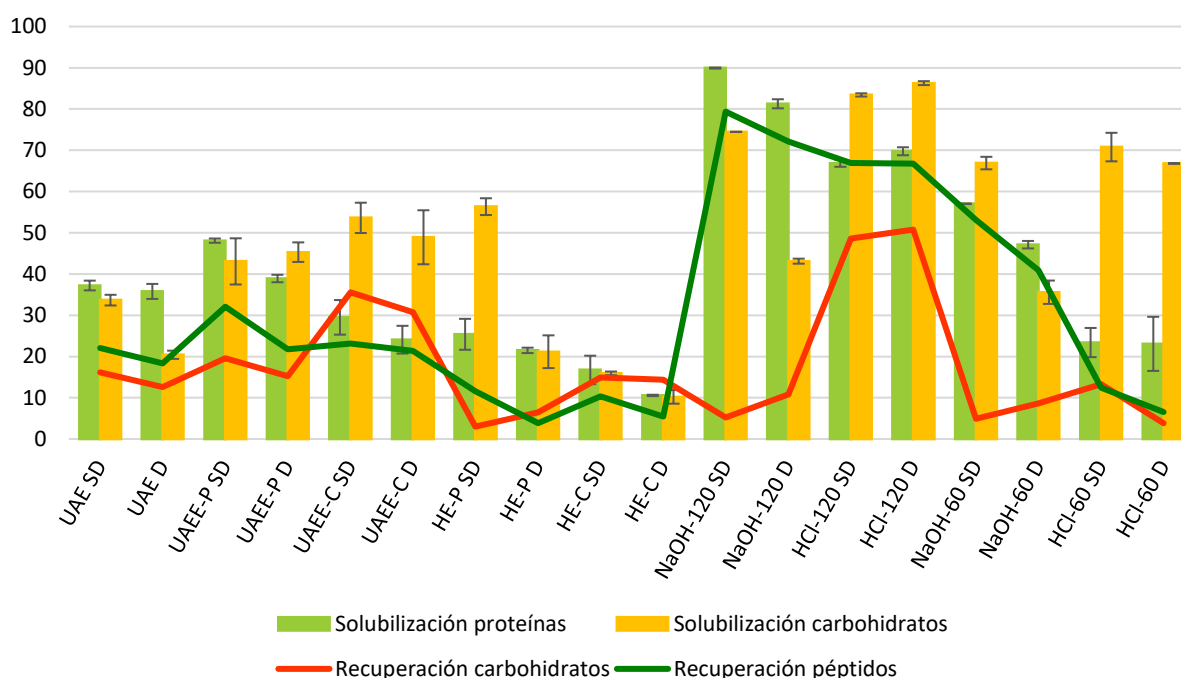
**Tabla 8.** Composiciones en base seca (%) de las biomazas iniciales sin dopar (SD) y dopada con fármacos veterinarios (D). Los resultados se expresan como medias ± desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). Los valores medios con la misma letra no son significativamente diferentes para  $p < 0.05$  según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Con los datos generados se pudieron apreciar algunas diferencias de composición entre las biomazas. Con el test de rangos de Duncan ( $p < 0.05$ ) se detectaron diferencias significativas para las composiciones de carbohidratos, glucosa y xilosa. Las cantidades de ceniza presentes en la biomasa son casi idénticas para ambas, pero son considerablemente más bajas que el 19.8% de media obtenido en estudios previos para muestras de biomasa formada por un consorcio microalga-bacteria crecido también en efluente de purín de cerdo (22). En ambas biomazas se observa una elevada proporción de proteínas y carbohidratos, mientras que el porcentaje de lípidos es menor. Esta repartición en el contenido de los tres macrocomponentes es común para biomazas microalgales crecidas en fotobiorreactores alimentados con purín (22), ya que las condiciones de estrés de este medio de cultivo inducen a la producción de proteínas y carbohidratos, pero no de lípidos. El contenido de proteínas y de carbohidratos totales para la biomasa sin dopar se diferencia en apenas un 2%, mientras que la biomasa dopada con fármacos esta diferencia se incrementa en un 9.1%, con un mayor porcentaje de proteínas que la muestra sin dopar y menos cantidad de carbohidratos. En investigaciones realizadas en el año 2021 sobre la composición bioquímica de microalgas crecidas en un medio dopado con diferentes fármacos, como paracetamol, mostraron una mayor acumulación de proteínas y disminuyendo la de carbohidratos. Concluyeron que la causa de este hecho fue que la enzima glutatión propia del paracetamol forma interacciones con la microalga, lo que provoca la oxidación de las células microalgales y desfavorece la formación de carbohidratos y lípidos (54). Esta diferencia podría ser debida

también a que los fármacos veterinarios pudieran ser una fuente de nitrógeno para las microalgas, favoreciendo la producción de proteínas y limitando la acumulación de carbohidratos y lípidos. Investigaciones previas han demostrado que la presencia de concentraciones de SDZ de hasta 100 mg/L favorecen el crecimiento biomasa formada por un consorcio microalga-bacteria (19,55). En cuanto a la composición desglosada de carbohidratos, no hay ninguna duda en que el monosacárido principal es la glucosa, pero se aprecia una reducción del 5.4% en su composición para la biomasa dopada, mientras que la xilosa aumenta un 1.4% y la celobiosa y la arabinosa siguen apareciendo a nivel de trazas (< 1%).

En la *Figura 4* se muestran de forma comparativa los rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos que se obtuvieron en función del método de extracción aplicado sobre las muestras de biomasa sin dopar y dopada con fármacos veterinarios, junto con los rendimientos de recuperación de carbohidratos y de aminoácidos.

### Rendimiento de extracción para el ensayo 1 (%)



**Figura 4.** Comparación de los rendimientos de solubilización de proteínas y carbohidratos (%) y las recuperaciones de carbohidratos y aminoácidos (%) de las muestras de biomasa sin dopar (SD) y dopada con fármacos veterinarios (D) en función del método de extracción aplicado. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica).

Aunque más adelante los datos se explican de forma más detallada, un primer vistazo a la gráfica permite deducir que, tanto para las proteínas como para los carbohidratos, los métodos de extracción más eficaces son los métodos químicos, sobre todo cuando se emplea temperatura elevada de trabajo. Sin embargo, parece que las solubilizaciones de proteínas mejoran al utilizar pH básico (NaOH-120), mientras que en el caso de los carbohidratos la solubilización es mayor en medio ácido (HCl-120). Destaca también que para los carbohidratos los rendimientos de recuperación únicamente sean buenos al emplear medio ácido, mientras que para las proteínas es similar en ambos pH. En cuanto a las diferencias entre biomasa sin dopar y dopada con fármacos veterinarios, parece que su presencia sí afecta de manera considerable en la solubilización de carbohidratos para los casos en los que se utilizan ultrasonidos (UAE) o medio básico a ambas temperaturas (NaOH-120/60). Más adelante se analizarán estas diferencias mediante la prueba de rangos múltiples de

Duncan para conocer qué métodos aportan diferencias significativas entre ambas biomásas, lo que implicaría que la presencia de los fármacos afecta a la capacidad de extracción del método.

## 4.2. Influencia de los metales en la composición de la biomasa

En el ensayo 2, el fotobiorreactor se dopó con tres metales pesados diferentes obteniéndose otras dos biomásas diferentes (SD y D). Del mismo modo que en el apartado anterior, primero se realizó un estudio comparativo de las composiciones de los tipos de biomasa inicial, a la que no se le ha aplicado ningún tratamiento. Los resultados obtenidos se reflejan en la siguiente *Tabla 9*.

	Biomasa SD	Biomasa D
<b>Cenizas (%)</b>	17.76	27.59
<b>Proteínas (%)</b>	44.9 ± 1.99 <sup>a</sup>	45.4 ± 0.29 <sup>a</sup>
<b>Carbohidratos (%)</b>	25.1 ± 0.55 <sup>a</sup>	19.7 ± 0.11 <sup>b</sup>
<b>Glucosa (%)</b>	17.4 ± 0.30 <sup>a</sup>	12.2 ± 0.03 <sup>b</sup>
<b>Xilosa (%)</b>	6.9 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.7 ± 0.06 <sup>a</sup>
<b>Lípidos (%)</b>	14.1 ± 1.31 <sup>a</sup>	9.9 ± 1.3 <sup>b</sup>
<b>Factor N-P</b>	4.15	4.08
<b>Cobre (%)</b>	0.01	2.81
<b>Zinc (%)</b>	0.02	1.84
<b>Arsénico (%)</b>	0.0003	0.003

**Tabla 9.** Composiciones en base seca sin cenizas (%) de las biomásas iniciales sin dopar (SD) y dopada con metales (D). Los resultados se expresan como medias ± desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica). Los valores medios con la misma letra no son significativamente diferentes para  $p < 0.05$  según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Antes de analizar los datos de composición generados para estas biomásas, cabe destacar que su periodo de crecimiento en el fotobiorreactor coincidió con el fenómeno meteorológico de calima que llegó a España en el mes de marzo (concretamente, a partir del día 15 de marzo del 2022) y perjudicó mucho al sur del país. No se sabe con certeza si la presencia de este polvo arenoso en las muestras va a afectar de alguna manera a los resultados, pero con seguridad sí lo hará con la cantidad de cenizas (materia inorgánica y minerales) presentes en la biomasa obtenida. El periodo de calima tuvo lugar desde el día 12 de cultivo del ensayo con metales, por lo que toda la biomasa recogida y utilizada en el estudio se vio afectada.

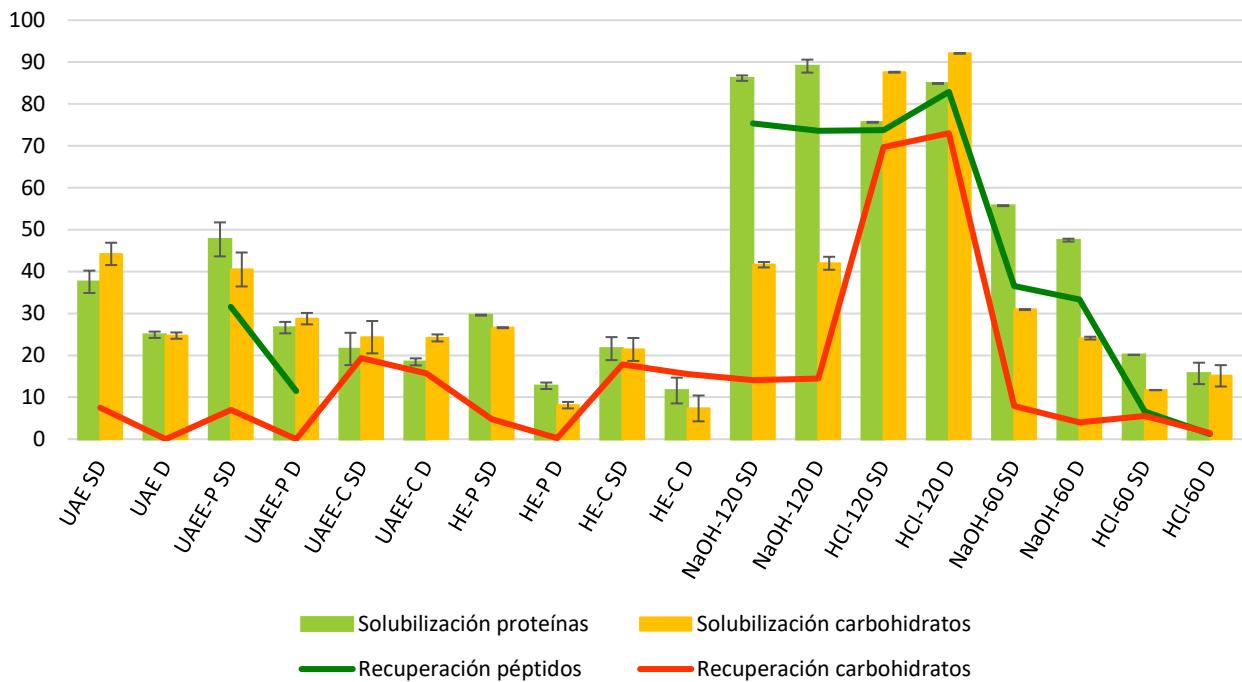
Estas muestras apenas poseen humedad, ya que la cantidad de sólidos totales es siempre superior a 98%, pero es necesario tenerlo en cuenta para calcular la concentración de cada macrocomponente en función a la biomasa seca. Como era de esperar, debido a la calima el nivel de cenizas que componen las biomásas es muy alta. Sin embargo, destaca que la biomasa dopada utilizada (recogida el día 33 del ensayo) posee un porcentaje de cenizas del 27.6%, mientras que la biomasa del cultivo sin dopar (recogida el día 12) posee un 17.8% de cenizas. Sin embargo, esta amplia diferencia en la composición de cenizas de las biomásas no puede explicarse únicamente teniendo en cuenta la calima, es probable que se deba a la precipitación de las sales metálicas que se añadieron como dopante. El porcentaje de proteínas es semejante para ambas biomásas, siendo ligeramente mayor (0.5%) en el caso de la dopada y, además, los factores N-P son prácticamente idénticos. La composición de carbohidratos es cercana a la mitad de la de proteínas para ambas biomásas y también hay diferencias entre la biomasa sin dopar y dopada, siendo un 6% menor en la segunda. El monosacárido mayoritario es la glucosa, siendo su concentración en ambos casos un 6% más alta que la de la xilosa, mientras que la celobiosa aparece a nivel de trazas. Se observó, además, que la composición de glucosa disminuyó de un 17.4% hasta un 12.2% cuando se dopó con metales. La concentración de lípidos es baja para las dos biomásas, pero un 4% más baja para la dopada. La bibliografía permitió saber que la presencia de metales en el medio genera un estrés oxidativo que deriva en una bajada de la composición de

carbohidratos, sobre todo glucosa (56). Por ejemplo, el Zn puede producir acumulación intracelular de metales y producción de especies reactivas de oxígeno que modifiquen la estructura molecular las proteínas y dañen los lípidos y los carbohidratos (57). El análisis estadístico con la prueba de rangos múltiples de Duncan mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las composiciones tanto de carbohidratos (más concretamente la glucosa) como de lípidos, lo que permitió deducir que el dopaje con metales pesados afecta a la composición y el crecimiento de la biomasa microalgal, tal y como indicaba la bibliografía.

Así mismo, para el ensayo 2 con metales pesados, se realizó un análisis de ICP-OES tanto sobre las biomásas dopadas con metales pesados como las biomásas sin dopar, con el fin de comparar la cantidad presente de cada metal en cada una de las biomásas. Como era de esperar, la cantidad de metales en la biomasa dopada es 2 órdenes superior en el caso del cobre y el zinc y tan sólo de un orden para el arsénico, siendo siempre la proporción de éste mucho inferior al resto. En el caso de la biomasa dopada, la cantidad de cobre retenida por la biomasa es mayor, ya que se alcanzó un 2%. El resultado permite concluir que este tipo de biomasa favoreció la absorción de cobre sobre los otros metales. Bibliografía previa (25) indica que la biomasa de consorcio microalga-bacteria presenta una tendencia a acumular Cu y Zn, afectando a su crecimiento de manera negativa, además de reducir el número de especies heterótrofas encargadas de la oxidación de los compuestos orgánicos, lo cual hace que disminuya también la eficacia de eliminación de carbono orgánico del medio (mayor TOC). Sin embargo, estos efectos no se observaron en el caso del As, ya que las microalgas han desarrollado a lo largo de la evolución una resistencia a este metaloide como consecuencia de los mecanismos de detoxificación que hace que, aunque la biomasa lo adsorba, no se bioacumule de manera tan importante como el cobre o el zinc (25).

En la *Figura 5* se muestra una gráfica que compara las capacidades de solubilización de proteínas y carbohidratos obtenidas para cada método de extracción y en función de si la biomasa estaba dopada o no con metales pesados, además de los porcentajes de recuperación de carbohidratos y aminoácidos para cada caso. En este caso, no se llevaron todas las muestras porque se comprobó que los resultados que proporcionaba el laboratorio de LTI de la Universidad de Valladolid no eran muy precisos, por lo que se llevaron únicamente aquellos con los que se había conseguido una mayor extracción de proteínas.

## Rendimientos de extracción para el ensayo 2 (%)

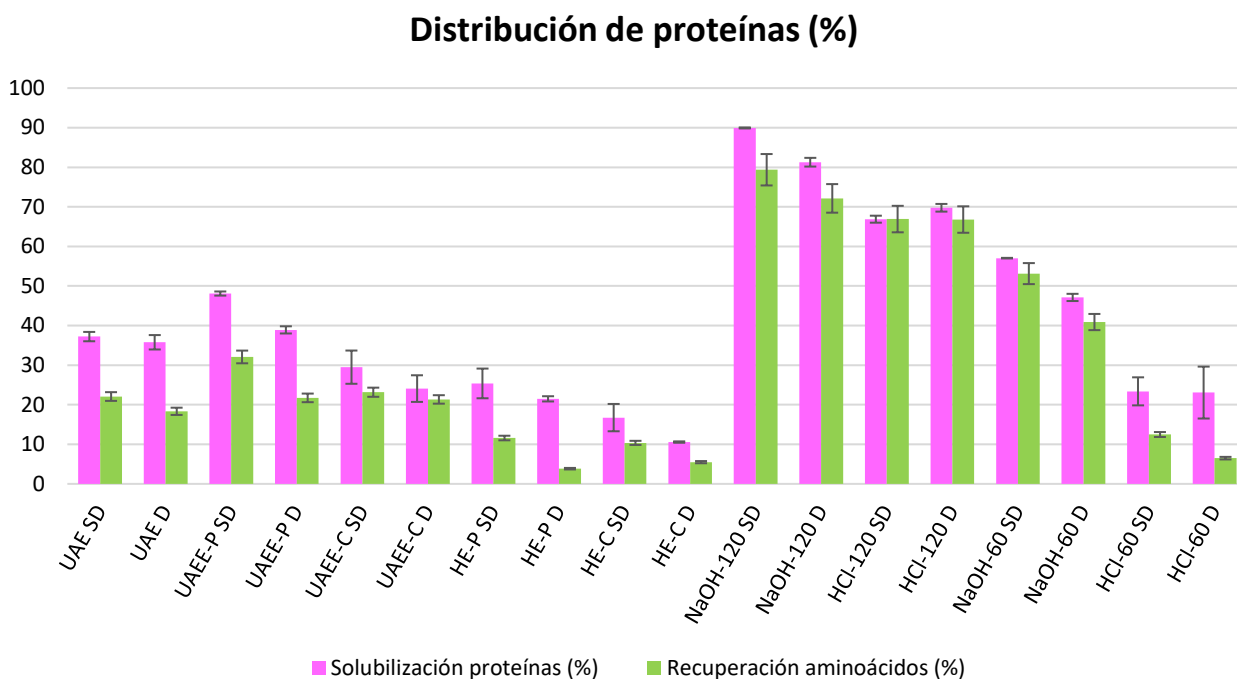


**Figura 5.** Comparativa de los rendimientos de solubilización (%) de proteínas y carbohidratos de las muestras de biomasa sin dopar (SD) y dopada (D) en función del tratamiento de extracción aplicado. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica).

Los resultados globales para la extracción de proteínas y carbohidratos de las muestras de biomasa para el segundo ensayo indican sin ningún tipo de duda que la mejor opción es utilizar métodos de extracción por hidrólisis ácida o básica siempre que sea a 120°C (NaOH/HCl-120). En el caso de las proteínas, los rendimientos de solubilización fueron superiores al 80% para ambos pH, siendo ligeramente superiores en medio básico. Sin embargo, las solubilizaciones de carbohidratos son incluso un 50% superiores en medio ácido (HCl-120) que en medio básico (NaOH-120). Los rendimientos de solubilización de proteínas cuando se emplearon métodos más suaves (ultrasonidos, hidrólisis enzimáticas y la combinación) fueron más bajos, pero destaca el caso de las hidrólisis enzimáticas, ya que los porcentajes de solubilización de proteínas para la biomasa dopada fueron más de un 10% más bajas que los obtenidos para la biomasa sin dopar. Esta diferencia también se vio para los carbohidratos, pero llegando a ser incluso de un 17%. Las recuperaciones siguieron las mismas tendencias que las solubilizaciones, tanto para los aminoácidos en caso de las proteínas como para los carbohidratos. Se consiguieron recuperar el 73.6% de los aminoácidos de la biomasa dopada con metales pesados para la hidrólisis básica a 120°C (NaOH-120 D) y el 82.9% para la hidrólisis ácida (HCl-120 D). Más adelante se analizarán mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan todas estas diferencias con el fin de conocer qué métodos aportan diferencias significativas entre ambas biomasa, lo que implicaría que la presencia de los metales pesados afecta a la capacidad de extracción del método.

### 4.3. Influencia de los fármacos en la solubilización de proteínas y recuperación de péptidos

En la *Figura 6* se representan los resultados generados para la solubilización de proteínas y recuperación de aminoácidos en las fases líquidas para cada uno de los métodos de extracción estudiados sobre las muestras de biomasa microalgal sin dopar y dopada con fármacos veterinarios. Según el balance de nitrógeno obtenido mediante NKT, las pérdidas de nitrógeno fueron menores del 8% en todos los ensayos.



**Figura 6.** Comparación de las solubilizaciones de proteínas y recuperaciones de aminoácidos conseguidas para cada tratamiento realizado a las muestras de biomasa alimentada con purines antes (SD) y después (D) de ser dopado con fármacos veterinarios. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica).

Con un primer vistazo a la gráfica se puede ver que los métodos químicos son, en general, más eficaces para la extracción de proteínas que los enzimáticos y los ultrasonidos, ya que se consiguen porcentajes de solubilización y de recuperación del componente muy altos.

Un análisis más detallado de los resultados permite conocer que el porcentaje de solubilización de proteínas para las muestras tratadas por UAEE con enzima Protamex™ (48.1% para UAEE-P SD) y fue más alto que los que se consiguen cuando se aplica UAE (37.2% para la muestra SD) y ambos tratamientos combinados (29.5% para UAEE-C SD) fueron más efectivos que las hidrólisis enzimáticas (25.4% para HE-P SD y 16.7% para HE-C SD), por lo que el uso complementario de estos dos métodos fue más eficaz para la extracción de proteínas. No obstante, no se detectaron mediante el test de Duncan ( $p < 0.05$ ) diferencias significativas entre la utilización de UAE o UAEE, pero sí entre el tipo de enzima utilizada, ya que las solubilizaciones que se consiguieron cuando se utiliza enzima Protamex™ fueron significativamente mayores a las obtenidas con Celluclast™. En todos los casos se obtuvo una solubilización de proteínas menor cuando se trató la biomasa dopada con fármacos, los casos más agravados fueron aquellos en los que se empleó enzima Celluclast™, hallando diferencias significativas entre las solubilizaciones de las biomazas dopadas y sin dopar. Para el tratamiento con el método combinado (UAEE-C D) se solubilizaron el 24.1% de las proteínas y con la hidrólisis enzimática (HE-C D) el 10.6%. Cuando se utilizó UAE la solubilización tan sólo disminuyó un 1.4% para la biomasa dopada, un 3.9% para el método enzimático (HE-P) y un 9.2% al emplear extracción por

el método combinado (UAEE-P D). Esta misma tendencia de solubilización de proteínas se vio en el estudio realizado en el año 2021 por el ISP y la Universidad de Valladolid sobre biomasa formada por un consorcio de microalga *Scenedesmus* y bacteria crecida en un fotobiorreactor alimentado por purín (41), consiguiendo rendimientos que apenas se diferenciaban en un 5% de los conseguidos en el actual estudio. Las recuperaciones alcanzadas en estos tratamientos son moderadas, consiguiendo la máxima en el tratamiento UAEE-P (38.9%) y la mínima para el HE-C (10.6%). No se detectaron con la prueba de Duncan diferencias significativas entre las capacidades de extracción de proteínas entre las biomásas sin dopar y dopada con fármacos veterinarios cuando se usaron los métodos de extracción por UAE, hidrólisis enzimática (con cualquiera de las dos enzimas) o UAEE con Celluclast™, pero sí al emplear UAEE con Protamex™.

Los tratamientos de extracción en medio ácido (HCl-120 y HCl-60) alcanzaron solubilizaciones y recuperaciones más bajas que los tratamientos en medio básico (NaOH-120 y NaOH-60), lo cual coincide con conocimientos previos que afirman que el medio básico favorece la solubilización de proteínas (39). Una explicación de estos resultados es que en medio básico fuerte se rompen los enlaces intermoleculares existentes entre los polímeros que componen la pared celular de las microalgas. Para la biomasa sin dopar en medio básico a 120°C se consigue una solubilización de proteínas del 89.9%, mientras que a 60°C la solubilización se redujo al 57%. Para la biomasa dopada con fármacos veterinarios la solubilización fue del 81.3% cuando se trabajó a alta temperatura (NaOH-120 D) y del 47.1% al trabajar con temperatura moderada (NaOH-60). En medio ácido las solubilizaciones en la biomasa sin dopar fueron del 66.9% a 120°C (HCl-120 SD) y del 23.4% a 60°C (HCl-60 SD), para la biomasa dopada estos valores fueron del 69.8% y del 23.1%, respectivamente. Estos resultados coinciden por completo con lo visto en 2021 (41), ya que los porcentajes son casi idénticos para todos los tratamientos ácidos excepto para la extracción en pH ácido a alta temperatura de trabajo (HCl-120), cuyo rendimiento se redujo entorno a un 10% con respecto a 2021. Se detectaron a ambos pH diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) respecto a la temperatura de trabajo utilizada. Esto coincide con lo observado en investigaciones previas, que indicaban que a temperaturas más bajas la pared celular de la microalga preserva su integridad con mayor facilidad, de tal forma que no se consigue liberar por completo el contenido de la célula o romper de manera efectiva la pared celular (39,42). En medio ácido no se detectaron diferencias significativas en las capacidades de solubilización de proteínas en función del tipo de biomasa (sin dopar o dopada), pero en medio básico estas diferencias sí fueron significativas ( $p < 0.05$ ) a ambas temperaturas según la prueba de rangos de Duncan.

Con los datos de recuperación de aminoácidos en las fases líquidas se obtuvieron conclusiones similares. Y las pruebas de rangos múltiples de Duncan indicaron que únicamente aparecen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las recuperaciones de aminoácidos de las biomásas sin dopar y dopada con fármacos cuando se utilizaron métodos de hidrólisis enzimática, recuperándose un mayor porcentaje de proteína en las muestras de biomasa sin dopar. Prácticamente en todos los casos (a excepción del tratamiento con HCl a 120°C) se produjeron pérdidas en la recuperación de proteínas, que sufrieron degradación y no se pudieron recuperar en forma de péptidos. No obstante, este porcentaje de pérdidas tan sólo es significativo entre las biomásas dopada y sin dopar cuando se aplica el método de extracción por UAEE, tanto con enzima Protamex™ como con Celluclast™. Los rendimientos de recuperación siguen la misma tendencia que la que siguieron en el estudio del ISP de 2021 (41), aunque la relación entre los valores concretos fue bastante dispar: casi un 15% superior para el método de ultrasonidos en este estudio respecto al de 2021 y entorno a un 8% superior en el caso del método combinado con Protamex™, pero casi un 10% inferior para la hidrólisis enzimática con esta misma enzima. En cuanto a los métodos químicos, las recuperaciones a 120°C fueron comparables, pero a 60°C mejoraron respecto al año 2021 entorno al 5% para medio ácido y a un 7% en medio básico.



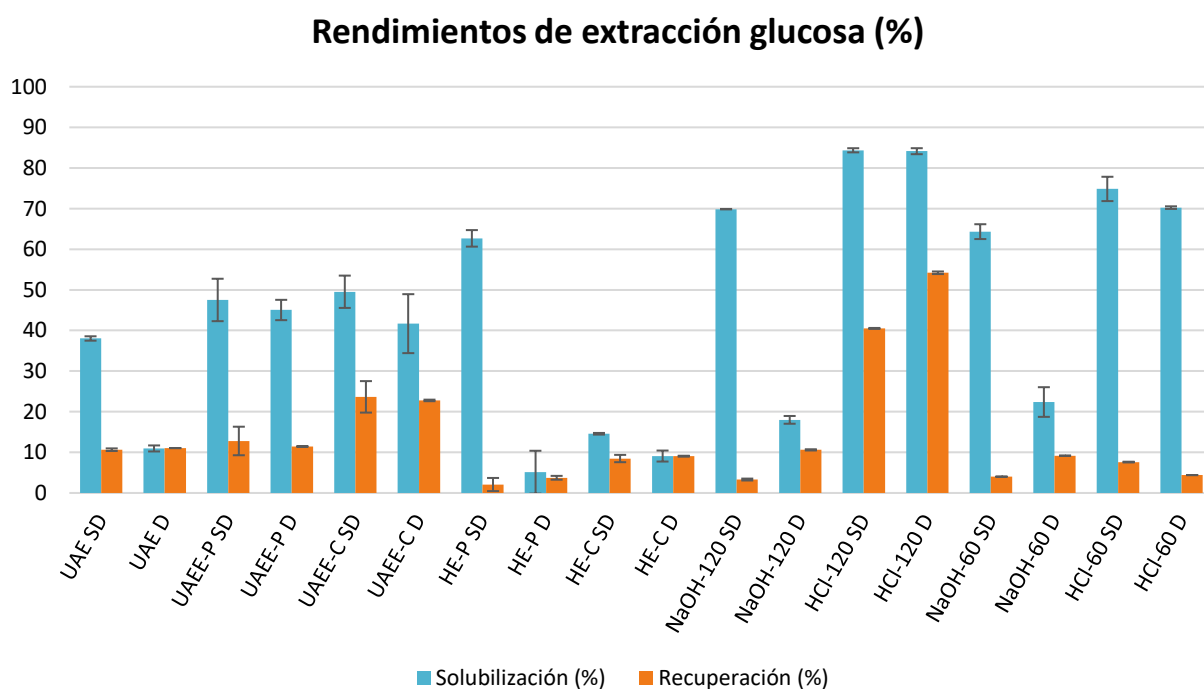
Para seleccionar el procedimiento de valoración más adecuado hay que tener en cuenta que los que mejor rendimiento de solubilización aportan son los tratamientos químicos a elevada temperatura, siendo la extracción con NaOH a 120°C la que mejores resultados consigue. Siendo ésta también, además, la opción que mayor porcentaje de recuperación de péptidos genera. Aunque es cierto que con la extracción en HCl a 120°C las pérdidas son menores que a pH básico, lo cual puede ser un factor que considerar.

#### 4.4. Influencia de los fármacos en la solubilización y recuperación de carbohidratos

Para el cálculo de las solubilizaciones y recuperaciones de carbohidratos se tuvieron en cuenta aquellos que se presentaban en mayor cantidad en la biomasa microalgal, que fueron la glucosa y la xilosa. Ambos se encontraban en concentraciones de mg/L. Con el fin de hacer un análisis más exhaustivo de los resultados, cada uno de ellos se estudió por separado.

##### Glucosa

Los resultados de los rendimientos de solubilización y recuperación de glucosa para cada tratamiento de extracción se reflejan en la siguiente *Figura 7*:



**Figura 7.** Comparación de las solubilizaciones y recuperaciones de glucosa (%) conseguidas para cada tratamiento realizado a las muestras de biomasa alimentada con purines antes (SD) y después (D) de ser dopado con fármacos veterinarios. Los errores de cada valor se calcularon mediante %SD.

En el caso de la glucosa, los resultados sobre solubilizaciones fueron bastante dispares. En medio ácido a 120°C (HCl-120) se consiguió solubilizar un 84.4% de la glucosa para la biomasa sin dopar, mientras que para la biomasa dopada se solubilizó el 84.1% y se recuperó el 54.2%. Las solubilizaciones alcanzadas a 60°C (HCl-60) son algo más bajas, pero con un mínimo del 70% para la biomasa dopada, lo cual convierte al tratamiento con HCl 2M en el método de extracción más eficaz para la glucosa, sobre todo si se trabaja a alta temperatura. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan para la solubilización de glucosa entre las muestras con presencia de fármacos y libres de ellos cuando se utiliza medio básico, tanto a 120°C (NaOH-120) como a 60°C (NaOH-60), ya que los rendimientos de

solubilización disminuyeron hasta un  $\approx 20\%$ , pudiéndose concluir que la presencia de los fármacos veterinarios influyó de forma muy negativa en la solubilización con este tratamiento. Esto podría implicar que el medio básico no es capaz de destruir las interacciones que se forman entre los fármacos y la glucosa y no puede liberarse. Investigaciones realizadas en 2021 por la Universidad de Valladolid y el ISP (41) sobre biomasa formada por un consorcio de microalgas *Scenedesmus* y bacterias crecidas en el mismo fotobiorreactor y cultivada en purines al 10% confirmaron los resultados obtenidos para la biomasa sin dopar, ya que las solubilizaciones de glucosa en medio ácido a 120°C que se obtuvieron rendimientos del 85% y entorno al 65% para el tratamiento a 60°C. En medio básico a 120°C los rendimientos también son comparables con los que ellos registraron (70%), pero el actual estudio aportó mejores resultados de solubilización de glucosa a 60°C, consiguiendo un 64% frente al casi 50% que se consiguió por aquel entonces. Además, dedujeron que esta diferencia de rendimientos entre temperaturas se debía a que a 60°C la energía que se aporta no es lo suficientemente grande como para descomponer la biomasa y, por tanto, no se completa la hidrólisis de los azúcares fermentables, impidiendo su extracción (41).

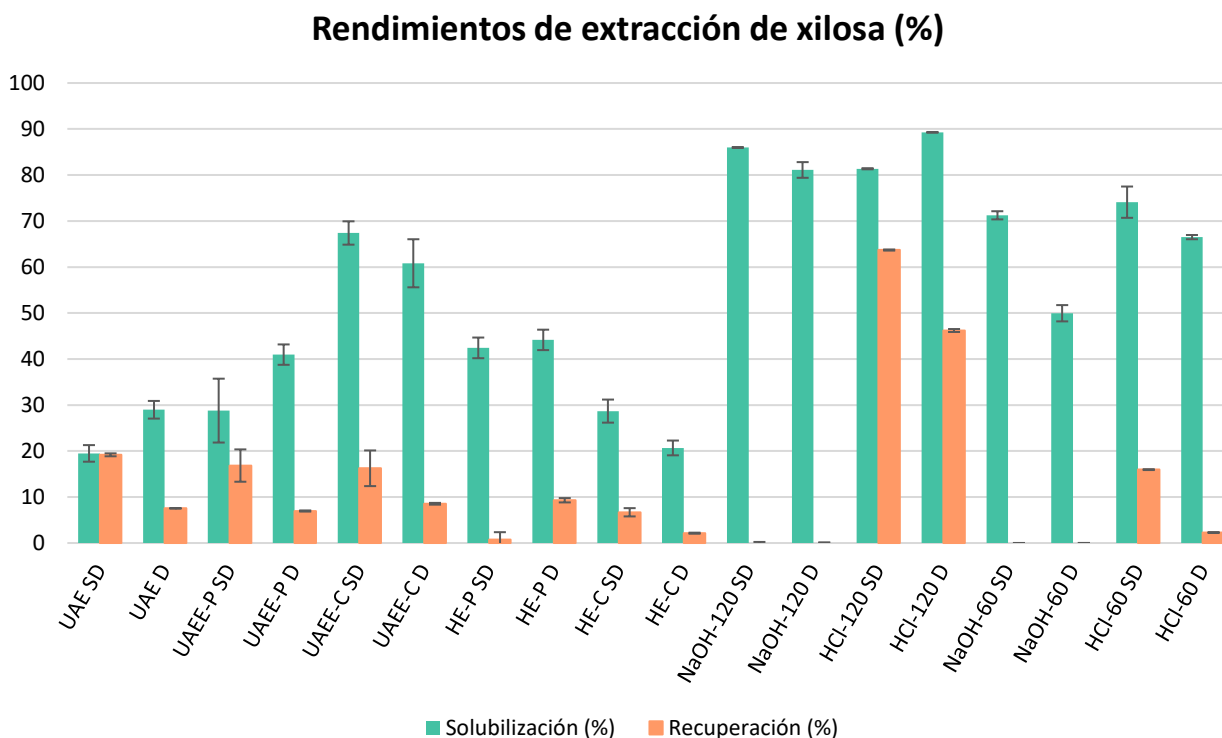
Aunque la solubilización de glucosa fue menor cuando se utilizaron métodos de extracción más suaves, como era de esperar, dentro de éstos, el que mejores resultados alcanzó es la UAEE, tanto para la biomasa sin dopar como para la dopada con fármacos. Por norma general, las solubilizaciones conseguidas con los tratamientos de ultrasonidos (UAE) y las UAEE (UAEE-P y UAEE-C) son mayores que las conseguidas con la hidrólisis enzimática individualmente (HE-P y HE-C), lo que podría dar a entender que los ultrasonidos afectan positivamente a la extracción de glucosa. Este aspecto ya fue confirmado en investigaciones previas realizadas por la Universidad de Valladolid y el ISP (36). Sin embargo, llama mucho la atención la gran diferencia de solubilización conseguida en la hidrólisis enzimática con Protamex™ (HE-P) cuando se aplicó sobre la muestra sin dopar frente a cuando se hace el experimento sobre la muestra dopada, ya que la solubilización se reduce del 62.7% para la primera al 5.1% para la segunda. Esto puede implicar la existencia de una interacción fuerte entre los fármacos y la glucosa que esta enzima no es capaz de romper, pero que la celulasa sí y por eso cuando se utiliza Celluclast™ (HE-C) esta diferencia, aunque también es significativa, no tan grande. Sin embargo, esto no sucede en el tratamiento UAEE con Protamex™ (UAEE-P) o Celluclast™ (UAEE-C), con los que la solubilización de glucosa no varía entre la biomasa dopada y la no dopada, algo que puede deberse que la combinación de ultrasonidos y enzimas sí consiguieron romper los enlaces y favorecer la solubilización de este monosacárido. Para la hidrólisis enzimática con Celluclast™ (HE-C) los resultados de solubilización fueron muy bajos, pero esto ocurrió en ambos tipos de muestra, lo que puede indicar que esta enzima precisa de la acción de los ultrasonidos para conseguir una extracción eficaz de carbohidratos en esta biomasa. Las mismas investigaciones que las indicadas anteriormente (41) también estudiaron el efecto de los ultrasonidos y la extracción combinada de éstos con enzima Protamex™, consiguiendo rendimientos idénticos. No obstante, tan sólo alcanzaron rendimientos del 40% para la hidrólisis enzimática con Protamex™.

En general, las recuperaciones de glucosa conseguidas fueron bajas, a excepción de para los tratamientos con hidrólisis química en medio ácido a 120°C (HCl-120) para ambos tipos de biomasa, y junto con el método combinado UAEE con Celluclast™ (UAEE-C), en menor medida. El estudio realizado por el ISP en 2021 (41) también llegó a la misma conclusión, alcanzando recuperaciones de glucosa cercanas al 70% para medio HCl 2M a 120°C, siendo para el resto de los tratamientos siempre inferior al 40%. Estos bajos porcentajes de recuperación podrían indicar que se produjeron pérdidas de glucosa durante el proceso. Cabe destacar que las recuperaciones conseguidas por hidrólisis química fueron, a excepción del tratamiento con HCl a 60°C, mayores para la biomasa dopada que para la no dopada: para el tratamiento con NaOH-120 la para la biomasa dopada se recuperó el 10.6% mientras que para la no dopada tan sólo el 3.3%, para el tratamiento HCl-120 se recuperó el 54.2% en la biomasa dopada y el 40.5% para la no dopada, para los tratamientos a en

medio básico a 60°C se consiguieron recuperaciones del 9.2% (NaOH-60 D) y del 4% (NaOH-60 SD). No se detectaron diferencias significativas entre las capacidades de recuperación de glucosa entre la biomasa dopada con fármacos y la biomasa sin dopar cuando se emplearon métodos de extracción por ultrasonidos (UAE), hidrólisis enzimática (HE-P/C) o el método combinado (UAEE-P/C). Sin embargo, estas diferencias sí fueron significativas para los métodos químicos, tanto a bajas como a altas temperaturas, por lo que parece que estos tratamientos ayudan a liberar con mayor facilidad la glucosa.

### Xilosa

Los resultados de los rendimientos de solubilización y recuperación de xilosa para cada tratamiento de extracción se reflejan en la siguiente *Figura 8*:



**Figura 8.** Comparación de las solubilizaciones y recuperaciones de xilosa conseguidas para cada tratamiento realizado a las muestras de biomasa alimentada con purines antes (SD) y después (D) de ser dopada con CE. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica).

Al igual que sucedía con la glucosa, los mejores rendimientos de solubilización de xilosa se consiguen con los métodos químicos, siendo mayores cuando se emplea elevada temperatura (NaOH/HCl-120). Aunque destacan también los buenos resultados obtenidos para ambas biomasa cuando se utilizó el método combinado de ultrasonidos con enzima Celluclast™ (UAEE-C). Para los tratamientos enzimáticos se observó que la solubilización de xilosa es mayor cuando se utiliza UAEE con enzima Celluclast™ (UAEE-C), con el que se consiguió una solubilización del 67.4% para la biomasa sin dopar y un 60.8% para la dopada, lo cual es lógico teniendo en cuenta que la celulasa es capaz de degradar los carbohidratos hasta monosacáridos y así se rompen las interacciones de los fármacos con la biomasa. Cuando se empleó enzima Protamex™ (UAEE-P) la solubilización se redujo a ser cercana al 40% para la biomasa dopada o incluso inferior al 30% para la biomasa sin dopar, por lo que esta enzima no es capaz de solventar las interacciones existentes, tal y como se explicó para la glucosa. Sin embargo, cuando se utilizó enzima Celluclast™ sin la aplicación de ultrasonidos (HE-C) la solubilización de xilosa no llegó al 30% para ninguna de las dos biomasa, esto implica que la utilización de ultrasonidos afecta positivamente a la capacidad de extracción de xilosa. Este mismo efecto beneficioso de los ultrasonidos en la capacidad de extracción de carbohidratos, proteínas y lípidos sobre

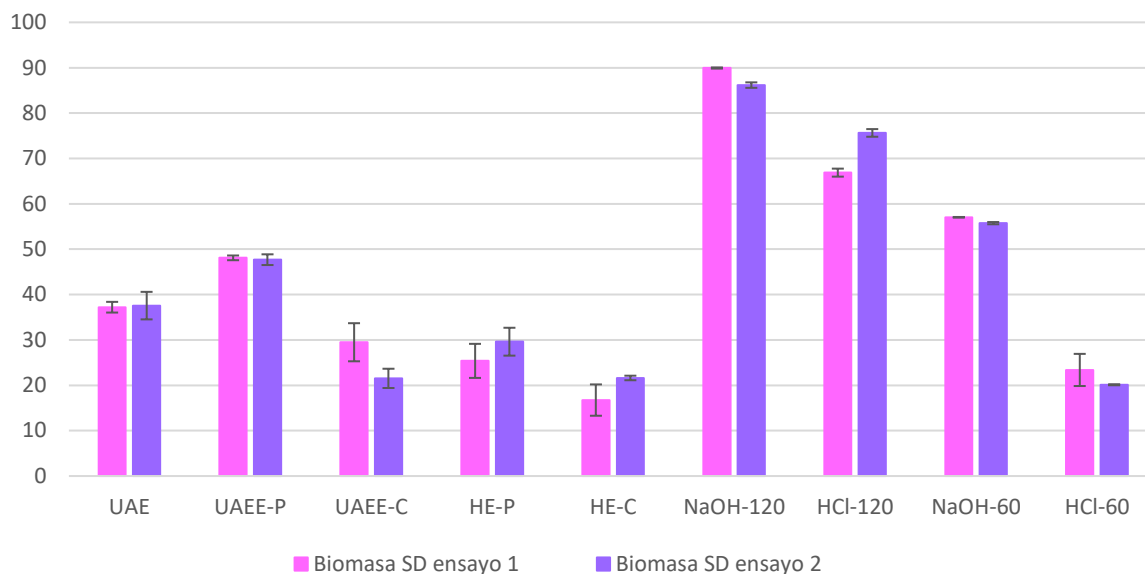
muestras de biomasa microalgal fue también observado por un grupo de investigación de la Universidad de Valladolid en 2020, obteniendo mejores rendimientos al incrementar el tiempo de exposición de la muestra a la acción de los ultrasonidos (40). Se detectaron diferencias significativas entre las capacidades de extracción de xilosa cuando se aplicó el método de extracción por ultrasonidos (UAE), siendo más alta la de la biomasa dopada (29% para la biomasa dopada y 19.5% para la biomasa sin dopar). No se detectaron diferencias significativas entre las eficacias de extracción de xilosa conseguidas para las biomosas dopadas y sin dopar con fármacos cuando se emplearon métodos de extracción con enzima Celluclast™, tanto por hidrólisis enzimática (HE-C) como por UAE (UAE-C). El estudio del ISP y la Universidad de Valladolid sobre biomasa consorcio de *Scenedesmus* con bacterias crecida en un fotobiorreactor alimentado con purines (41) indica una tendencia similar; sin embargo, por norma general, las extracciones fueron más eficientes (entre un 10 y un 20% mejores) que las observada en este análisis. Tan sólo cuando se empleó extracción por hidrólisis enzimática con Protamex™ (HE-P) se obtuvo el mismo rendimiento de solubilización.

Los porcentajes de recuperación de xilosa en las fases líquidas fueron muy bajos para todos los tratamientos excepto el tratamiento en medio ácido a 120°C, al igual que sucedía con la glucosa. Los estudios realizados por la Universidad de Valladolid en 2021 también aportaron recuperaciones del 54% para este mismo tratamiento, mientras que mediante UAE tan sólo se consigue el 4.5% de recuperación de monosacáridos (43). Para todos los métodos de extracción se cumplió que los rendimientos de recuperación eran mayores para la biomasa sin dopar que para la dopada. Esta diferencia fue significativa según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) para todos los métodos de extracción, es decir, que no cabe duda de que la presencia de los fármacos veterinarios en la matriz de crecimiento de las microalgas hizo que se generasen interacciones fuertes entre ellos, lo que provocó que los hidrolizados resultantes de cada tratamiento contuviesen una baja concentración de xilosa. Los rendimientos de recuperación de xilosa fueron para todos los tratamientos de extracción, mejores que los registrados por el estudio que el ISP hizo en 2021 (41), sobre todo en el caso de los métodos más suaves (UAE, UAE y HE), para los cuales las recuperaciones fueron nulas. Aunque ambos coinciden en que las recuperaciones más altas se consiguen aplicando extracción en medio ácido a 120°C (60%) y NaOH a 120°C (33%), consiguiendo una ligera recuperación de xilosa también con este pH a 60°C (< 10%).

## 4.5. Influencia de los metales en la solubilización de proteínas y la recuperación de péptidos

En primer lugar, se realizó un análisis comparativo de las solubilizaciones de proteína para la biomasa sin dopar obtenidas en este ensayo para cada método de extracción con respecto a las conseguidas en el ensayo con fármacos veterinarios. La finalidad de este análisis es comprobar que ambas biomosas sin dopar siguen la misma tendencia de comportamiento.

## Solubilizaciones de proteína entre ambos ensayos (%)

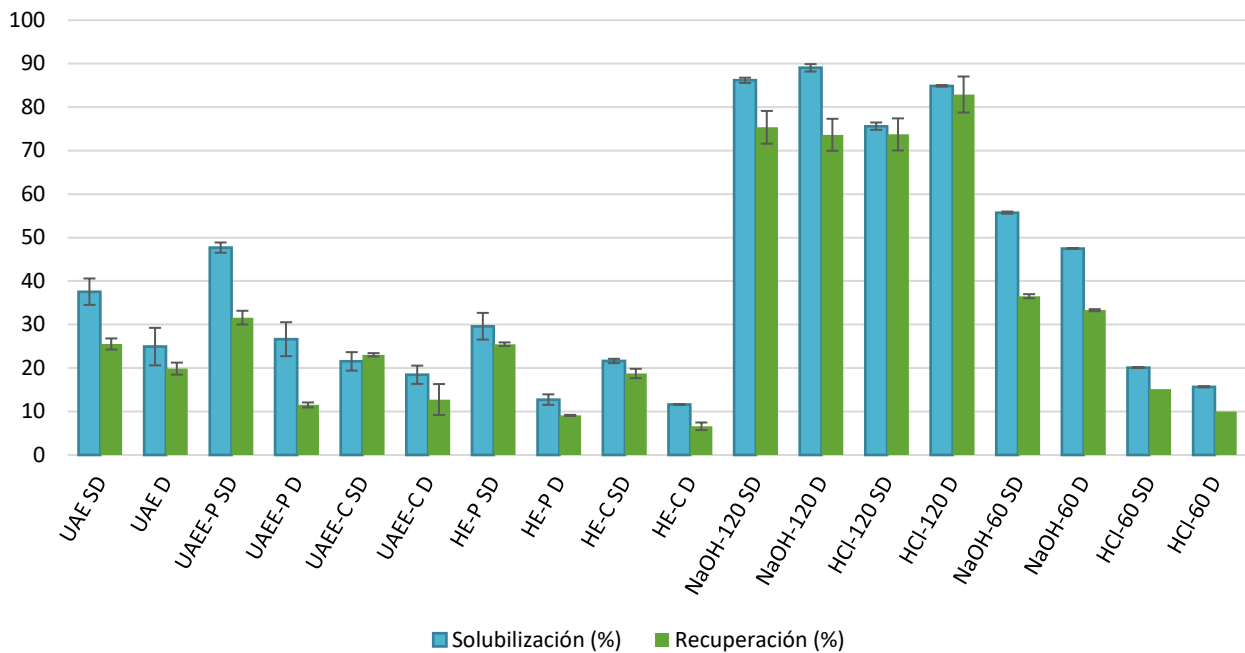


**Figura 9.** Comparativa de las solubilizaciones de proteína (%) obtenidas para las biomazas sin dopar (SD) del ensayo 1 (fármacos veterinarios) y el ensayo 2 (metales pesados) en función del método de extracción aplicado. Los errores de cada valor se calcularon mediante %SD.

No hubo duda alguna de que las biomazas categorizadas como no dopadas para ambos ensayos seguían el mismo comportamiento general. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas mediante la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) entre las solubilizaciones de proteína obtenidas mediante el método combinado de ultrasonidos con enzima Celluclast™ (UAEE-C), siendo significativamente menor para el ensayo 2 (metales pesados). Se observaron también en el tratamiento por hidrólisis ácida a 120°C (HCl-120), donde la solubilización fue significativamente mayor en el segundo ensayo respecto al primero. Hubo pequeñas diferencias en los rendimientos conseguidos con hidrólisis enzimática (HE), consiguiendo para ambas enzimas una mayor solubilización de proteínas en la biomasa del segundo ensayo. También se hallaron pequeñas diferencias, aunque tampoco significativas al igual que las anteriores, para los tratamientos con NaOH a ambas temperaturas (NaOH-120/60) y en medio ácido a 60°C (HCl-60), siendo en ambos casos la solubilización de proteínas mayor para la biomasa del ensayo 1. Para el resto de los métodos de extracción las solubilizaciones conseguidas fueron totalmente comparables y prácticamente idénticas.

A continuación, se muestran en la *Figura 10* los datos obtenidos de solubilización y recuperación de proteínas para las biomazas microalgales sin dopar y dopada con metales pesados en función del método de extracción utilizado. Según el balance de nitrógeno, las pérdidas fueron menores del 9% en todos los experimentos.

## Solubilización de proteínas y recuperación de péptidos (%)



**Figura 10.** Comparativa de las capacidades de solubilización de proteínas y recuperación de péptidos para cada método de extracción al que se han sometido las muestras de biomasa alimentada con purín antes (SD) y después (D) de ser dopado con metales. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica).

Únicamente los tratamientos de extracción mediante métodos químicos a 120°C consiguieron solubilizar proteínas y recuperarlas en forma de péptidos en porcentajes superiores al 70%, llegando a alcanzar incluso el 89% de la solubilización de proteínas para el tratamiento de la biomasa dopada con NaOH 2M (NaOH-120 D). Esto concuerda con los comportamientos encontrados en estudios previos, que indican que las microalgas tienen tendencia a formar interacciones fuertes del tipo metal-proteína con iones de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , llegando a formar complejos, que los tratamientos suaves (ultrasonidos, hidrólisis enzimática y su combinación) no son capaces de romper. Pero que, al modificar el pH del medio y volverlo más ácido, se van dissociando y permiten la liberación de las proteínas (58). No obstante, las hidrólisis ácidas (HCl-120) permitieron recuperar una mayor proporción de los péptidos, siendo tan sólo un 3.1% menor la recuperación de péptidos que la solubilización de proteínas para la biomasa dopada con metales (HCl-120 D). Por otro lado, estos métodos a baja temperatura no fueron eficientes, destacando los bajos rendimientos alcanzados para el tratamiento en pH ácido (HCl-60). Estudios previos del grupo (41) obtuvieron los mismos resultados, con una solubilización de proteínas en medio NaOH a 120°C del 85% y del 75% en medio HCl a esta misma temperatura, descendiendo para los tratamientos a 60°C al 54% y al 19% a cada respectivo pH.

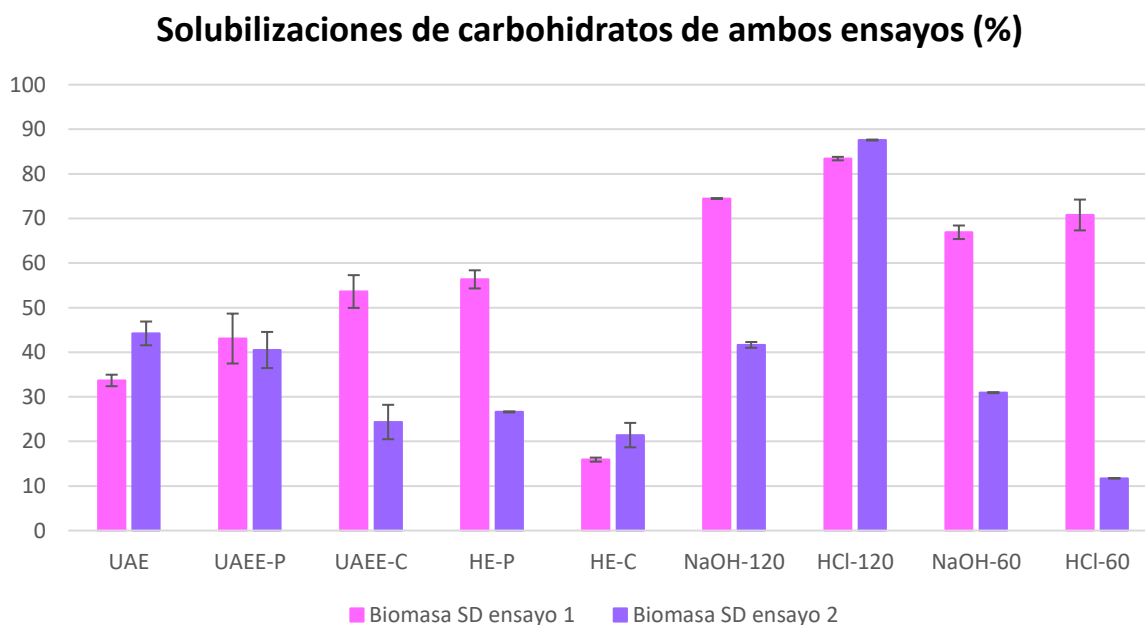
La prueba de rangos múltiples de Duncan detectó diferencias significativas entre las solubilizaciones conseguidas para la biomasa dopada cuando se emplearon métodos de extracción por ultrasonidos (UAE), lo cual difiere de lo visto con anterioridad para el ensayo con fármacos veterinarios. Estas diferencias también se vieron para el método combinado cuando se utilizó enzima Protamex™ (UAEE-P), pero no al utilizar Celluclast™ (UAEE-C). Permitted deducir que el tipo de enzima utilizada es clave para conseguir una solubilización más eficiente de las proteínas, tal y como ya se dedujo en investigaciones previas del grupo (41). Las extracciones mediante hidrólisis enzimática, ya sea empleando Protamex™ como Celluclast™, proporcionaron solubilizaciones significativamente diferentes entre las biomazas dopada y sin dopar, siendo en ambos casos más baja para la biomasa dopada. Esto permitió corroborar que los ultrasonidos ejercen un efecto positivo sobre la actividad enzimática, favoreciendo el proceso (45). Existen, además, evidencias

previas de que indican que la presencia de elevadas concentraciones de metales pesados, sobre todo de Zn y As, provocan la inhibición de las enzimas, lo cual explicaría los bajos rendimientos obtenidos con estos métodos de extracción (59). En cuanto a los métodos químicos, las diferencias significativas se detectaron en todos excepto para la hidrólisis básica a 120°C, para la que los rendimientos fueron similares. El tratamiento ácido a esta temperatura (HCl-120) consiguió solubilizar una cantidad de proteínas significativamente mayor en la biomasa dopada que en la no dopada, mientras que en los tratamientos a ambos pH a menor temperatura (NaOH/HCl-60) los rendimientos disminuyeron significativamente para la biomasa dopada. Esto coincide con lo recogido en estudios previos del grupo, que afirman que la temperatura de trabajo es un factor determinante del proceso (41).

Las recuperaciones de aminoácidos siguieron la misma tendencia que las solubilizaciones, y de nuevo las diferencias significativas entre los valores conseguidos con la biomasa sin dopar y dopada con metales se encontraron para los tratamientos por hidrólisis enzimática (HE-P y HE-C), el método combinado con Protamex™ (UAEE-P) e hidrólisis ácida a 60°C (HCl-60), no así para las mismas condiciones en medio básico (NaOH-60), para el cual los rendimientos de recuperación de péptidos apenas variaron entre ambas biomazas.

## 4.6. Influencia de los metales en la solubilización y recuperación de carbohidratos

Del mismo modo que en el caso de las proteínas, para corroborar que las biomazas sin dopar utilizadas en ambos ensayos siguen la misma tendencia de comportamiento, es necesario hacer un estudio comparativo de las solubilizaciones de carbohidratos obtenidas en el ensayo dos (metales pesados) para cada método de extracción con respecto a las conseguidas en el ensayo con fármacos veterinarios.

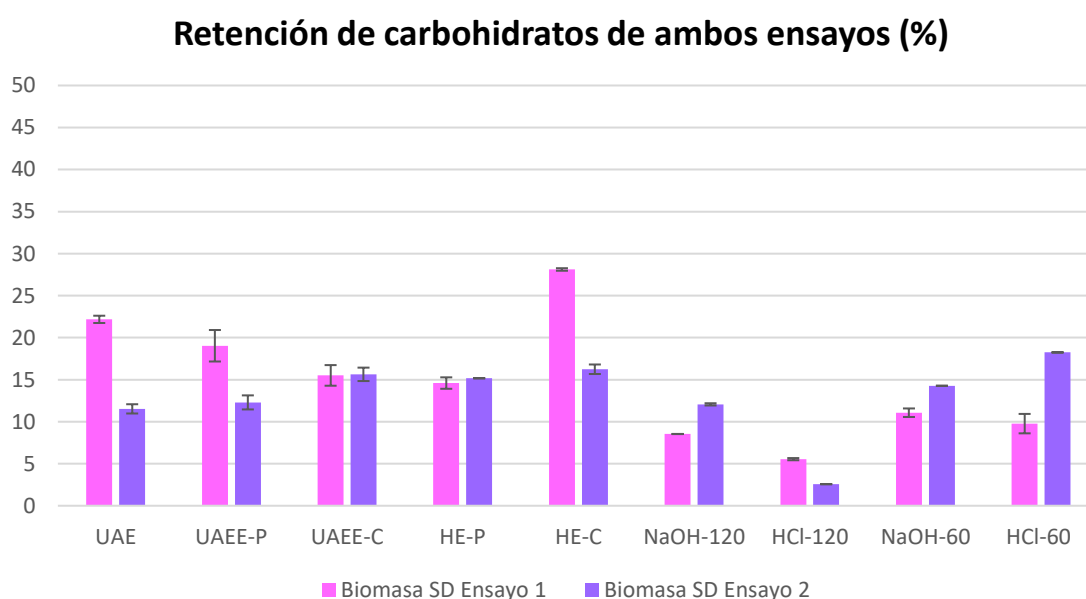


**Figura 11.** Comparación de los rendimientos de solubilización de carbohidratos (%) obtenidos para las biomazas sin dopar (SD) de los ensayos 1 (fármacos veterinarios) y 2 (metales pesados) en función del método de extracción aplicado. Los errores de cada valor se calcularon mediante %SD.

Se observaron claras diferencias entre los rendimientos de solubilización de hidratos de carbono entre las biomazas sin dopar de ambos ensayos en casi todos los casos. Únicamente se registraron resultados

comparables para las extracciones con ultrasonidos (UAE), el método combinado con enzima Protamex™ (UAEE-P), la hidrólisis enzimática con Celluclast™ (HE-C) y la hidrólisis ácida a elevada temperatura (HCl-120). En el resto de los tratamientos las solubilizaciones fueron significativamente (y en muy elevada proporción) más bajas para el segundo ensayo. Una posible explicación para este hecho es el efecto que tuvo el fenómeno de la calima durante el cultivo de la microalga, no obstante, esto no llegaría a explicar por qué las solubilizaciones son similares para los otros tres métodos mencionados.

No obstante, hay que tener en cuenta que la composición de carbohidratos iniciales totales de ambas biomazas sin dopar es distinta (33.43% para la biomasa sin dopar del ensayo 1 y 20.67% para la biomasa sin dopar del ensayo 2), lo cual podría influir en la cantidad proporcional de carbohidratos que se solubilizan, ya que en la microalga existen carbohidratos estructurales muy internos que es prácticamente imposible extraerlos. Por eso, se pensó en comparar los porcentajes de retención de carbohidratos para ambas biomazas en función del método de extracción empleado y proporcionalmente a la cantidad inicial de carbohidratos presentes en la microalga (*Figura 12*).



**Figura 12.** Comparativa de las retenciones de carbohidratos (%) para las biomazas sin dopar (SD) de los ensayos 1 (fármacos veterinarios) y 2 (metales pesados) en función del método de extracción aplicado. Los errores de cada valor se calcularon mediante %SD.

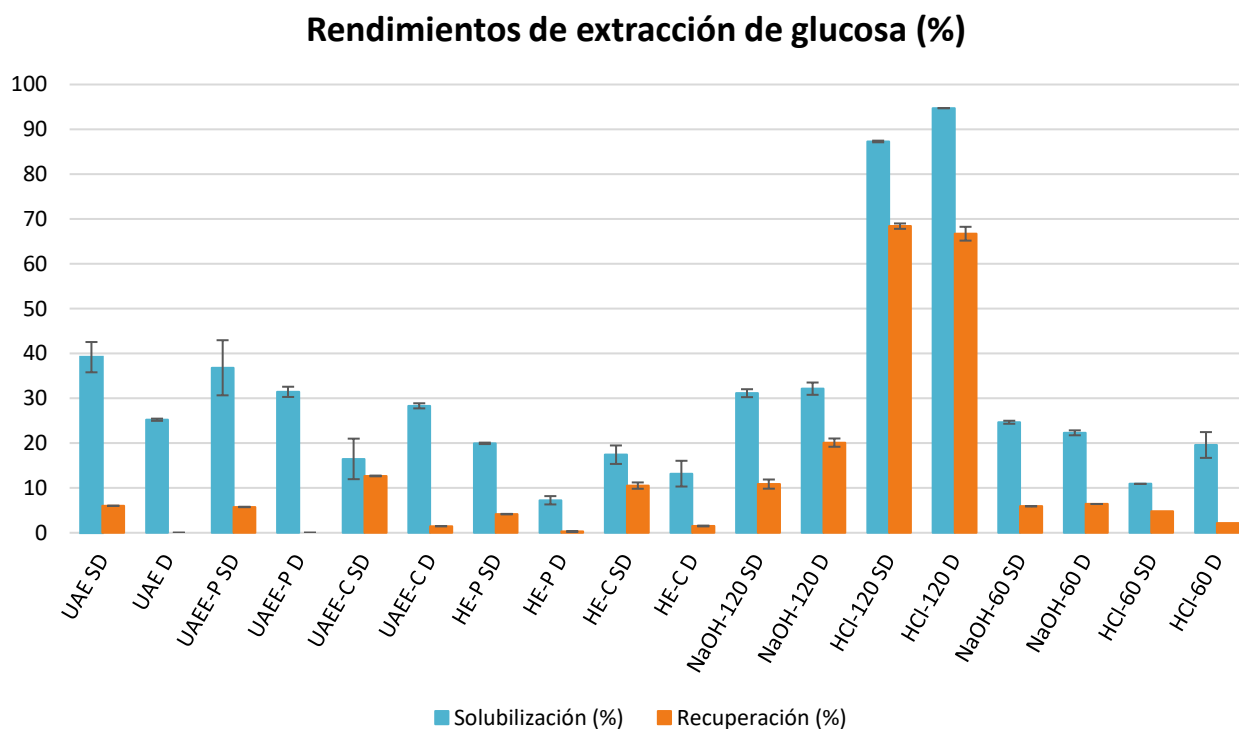
Los porcentajes de retención indicaban, que en la mayoría de los casos en los que se habían encontrado diferencias significativas en las solubilizaciones, las sospechas eran ciertas. Aunque las solubilizaciones varían, las retenciones de carbohidratos para los tratamientos por hidrólisis enzimática con Protamex™ y por UAEE con ambos enzimas eran comparables, al igual que las hidrólisis alcalinas a 120°C y 60°C, por lo que las capacidades de extracción de estos métodos fueron iguales para las biomazas sin dopar de los dos ensayos. No obstante, la retención de carbohidratos obtenida mediante hidrólisis ácida a 60°C para la biomasa sin dopar del ensayo 2 fue significativamente más alta que la de la biomasa del ensayo 1. No se encontró una explicación a este suceso, por lo que se pensó que era probable que esta diferencia se debiera a errores analíticos.

Una vez comprendido esto, se pasó al análisis de las solubilizaciones y recuperaciones de carbohidratos. Para el cálculo se tuvieron en cuenta los carbohidratos que se presentaban como mayoritarios en la biomasa microalgal, que fueron de nuevo la glucosa y la xilosa. Ambos se encontraban en concentraciones de mg/L. Con el fin de hacer un análisis más exhaustivo de los resultados, cada uno de ellos se estudia por separado.



## Glucosa

En la siguiente *Figura 13* se presentan los resultados de los rendimientos de solubilización y recuperación de glucosa para cada tratamiento de extracción:



**Figura 13.** Comparativa de las capacidades de solubilización y recuperación de glucosa (%) obtenidos para cada uno de los tratamientos a los que se han sometido las muestras de biomasa alimentada con purín antes (SD) y después (D) de ser dopada con metales. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica).

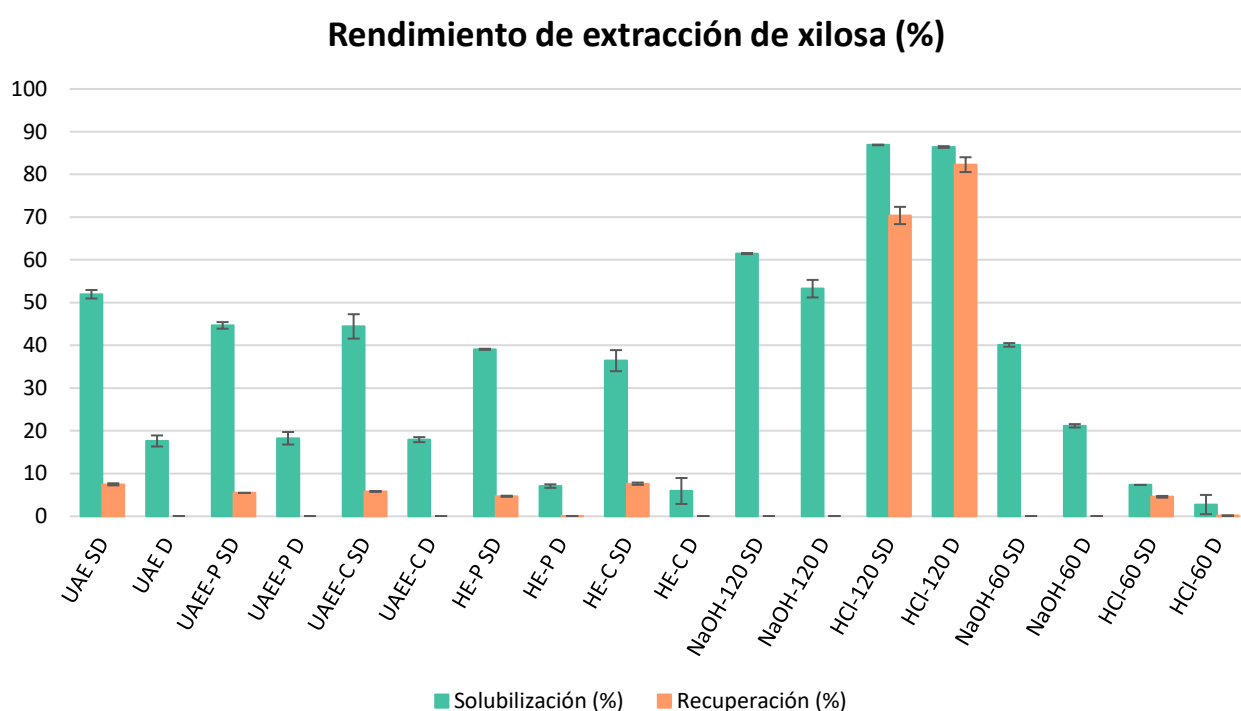
Los resultados indicaban que la extracción de glucosa fue efectiva únicamente cuando se aplicó el tratamiento en medio ácido a 120°C (HCl-120), consiguiendo buenos resultados para ambas biomasa e incluso mejorando para la biomasa dopada con metales pesados: rendimientos de solubilización del 87.3% para la biomasa sin dopar y del 94.7% para la biomasa dopada. Los resultados obtenidos eran comparables entre ambas biomasa (SD y D) cuando se aplicaron métodos de extracción por UAEE, tanto cuando se empleó enzima Protamex™ (UAEE-P) como con Celluclast™ (UAEE-C), por hidrólisis enzimática con Celluclast™ (HE-C) y por hidrólisis básica a ambas temperaturas (NaOH-60/120). Se hallaron diferencias significativas entre las solubilizaciones conseguidas para la biomasa dopada y la no dopada cuando se aplicaron métodos de extracción por ultrasonidos (UAE), hidrólisis enzimática con Protamex™ (HE-P) y por hidrólisis ácida a ambas temperaturas de trabajo (HCl-60/120). En el caso de las hidrólisis ácidas, se consiguió solubilizar una cantidad significativamente mayor de glucosa para las muestras de biomasa dopada que para la biomasa sin dopar (un 7.4% mayor a 120°C y un 8.7% mayor a 60°C), mientras que los demás casos esta diferencia significativamente menor (un 14% menor con UAE y un 12.7% menor con HE-P). Este comportamiento de la biomasa no coincide con lo visto para el ensayo 1 con fármacos veterinarios, donde se observaron diferencias significativas para los tratamientos en medio básico (NaOH-60/120), las dos hidrólisis enzimáticas (HE-P y HE-C) y los ultrasonidos (UAE). Esto indica que el dopaje con metales provocó un efecto diferente sobre la biomasa del que ejercieron los fármacos. Estudios previos (60) han demostrado que el  $\text{Cu}^{+2}$  forma complejos con carbohidratos en medios de pH básico, lo cual explicaría la reducida capacidad de extracción de los métodos de UAE y UAEE, ya que estos métodos serían demasiado suaves como para ser capaces de romper estas interacciones. Por otro lado, el rendimiento pobre de las extracciones

en medio básico se explica teniendo en cuenta que la solubilidad del cobre disminuye con el incremento del pH del medio, por lo que los complejos con los carbohidratos tampoco se alterarían (61).

Para todos los casos excepto para el HCl-120 (68.4% para la biomasa sin dopar y 66.7% para la dopada con metales) las recuperaciones recogidas son muy bajas, no superando el 20% y llegando a ser incluso nulas para algunas muestras dopadas (UAE D, UAEE-P D y HE-P D). Se detectaron diferencias significativas entre las recuperaciones conseguidas con los dos tipos de biomasa para todos los métodos de extracción, excepto para medio ácido a 120°C (HCl-120) y en medio básico a baja temperatura (NaOH-60). Esto no coincide con lo visto para el ensayo 1, ya que en ese caso las diferencias significativas sólo se registraron para los métodos químicos a ambos pH y a ambas temperaturas de trabajo.

### Xilosa

En la siguiente *Figura 14* se presentan los resultados de los rendimientos de solubilización y recuperación de xilosa para cada tratamiento de extracción:



**Figura 14.** Comparativa de las capacidades de solubilización y recuperación de xilosa obtenidos para cada uno de los tratamientos a los que se han sometido las muestras de biomasa alimentada con purín antes (SD) y después (D) de ser dopado con metales pesados. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar de dos determinaciones analíticas (experimento analizado en réplica).

El comportamiento de la xilosa con respecto a la solubilización es muy similar al visto para la glucosa, ya que sólo se consiguen rendimientos altos de solubilización al emplear medio ácido a 120°C (HCl-120), solubilizando un 86.9% de la xilosa para la biomasa sin dopar y un 86.4% para la dopada. Pero, en este caso, también se obtuvieron buenos resultados en medio básico a elevada temperatura (NaOH-120), con un 61.5% de xilosa solubilizada en la biomasa sin dopar y un 53.3% en la dopada con metales; y para la biomasa sin dopar por tratamiento con ultrasonidos, llegando a solubilizar el 52% de la xilosa y tan sólo el 17.6% en la biomasa dopada. Para todos los métodos de extracción utilizados los rendimientos fueron significativamente más bajos para las muestras de biomasa dopada con metales, a excepción de las hidrólisis ácidas, tanto a 60 como a 120°C (HCl-60/120).

Al igual que sucedió con la glucosa, los rendimientos de recuperación de xilosa fueron siempre muy bajos e incluso nulos (para los métodos de hidrólisis básica a ambas temperaturas), solamente para la hidrólisis ácida a 120°C (HCl-120) se recuperó el 70.4% de la xilosa para la biomasa sin dopar y el 82.3% para la dopada. Las diferencias de recuperaciones conseguidas para la biomasa dopada con metales y la no dopada fue significativa en todos los casos, siendo siempre menor para la biomasa dopada, menos para la hidrólisis ácida a alta temperatura como ya se ha dicho. Este comportamiento coincide con lo visto para las extracciones de xilosa en el primer ensayo con fármacos veterinarios.

Los valores obtenidos de glucosa y xilosa para las muestras dopadas eran demasiado bajos en prácticamente todos los casos, pero los cromatogramas (Figuras 16 y 17) no mostraban picos sospechosos que indicasen la presencia de otro tipo de monosacáridos, mientras que los cromatogramas de las muestras sin dopar (Figura 15) no eran tan limpios, sino que aparecían muchos picos pequeños. Por eso se planteó que era posible que una parte de los carbohidratos de las muestras dopadas con metales se hubiera degradado a formas orgánicas más simples. Con el fin de conocer si esto era cierto se llevó a cabo un análisis del carbono orgánico total.

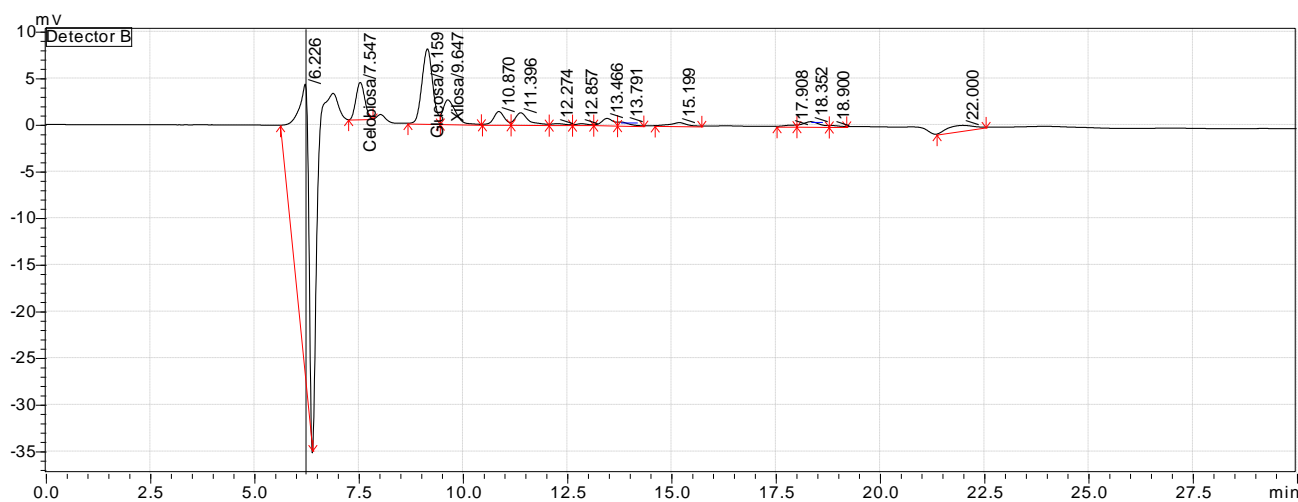


Figura 15. Cromatograma adquirido por HPLC de la muestra de biomasa sin dopar del ensayo 2 tratada mediante el método de extracción por UAEE con enzima Protamex™.

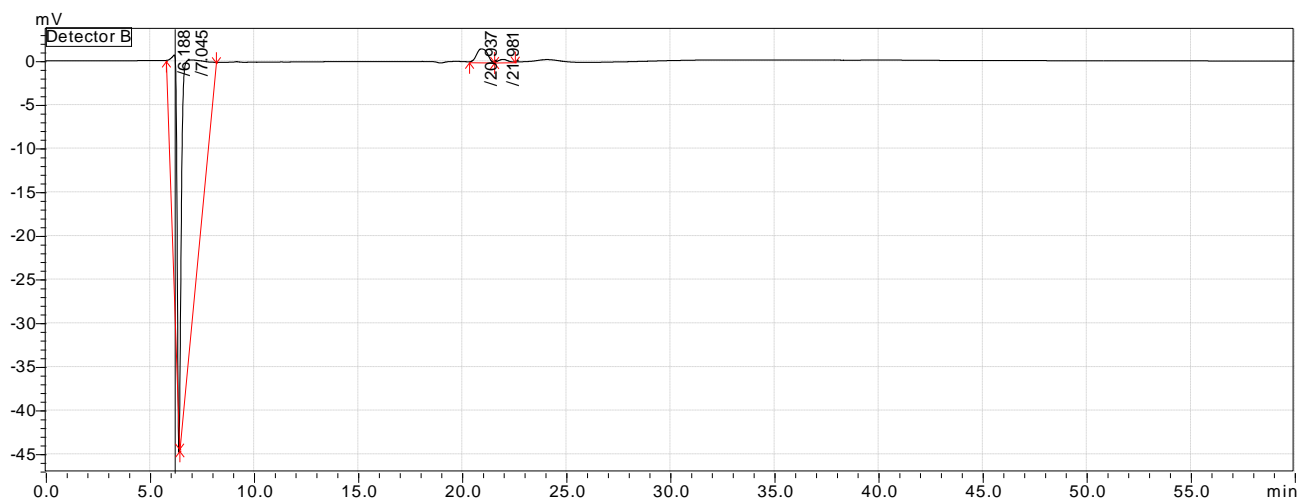
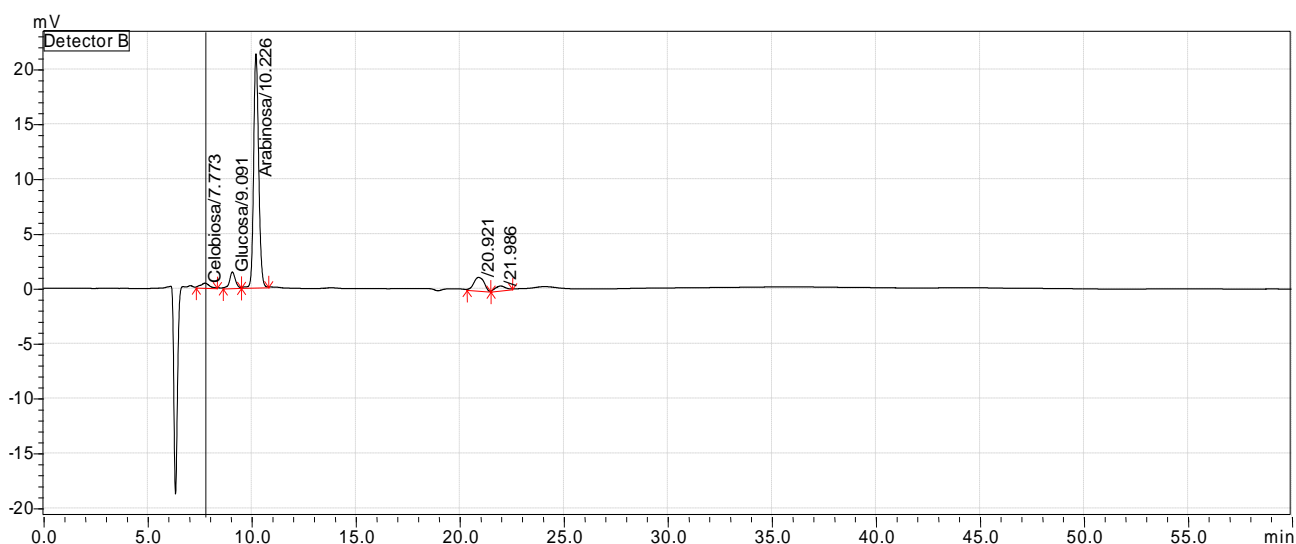


Figura 16. Cromatograma adquirido por HPLC de la muestra de biomasa dopada con metales pesados tratada mediante el método de extracción por UAEE con enzima Protamex™.



**Figura 17.** Cromatograma adquirido por HPLC de la muestra de biomasa dopada con metales pesados tratada mediante el método de extracción por hidrólisis enzimática con enzima Celluclast™.

#### 4.6.1. Análisis del carbono orgánico total (TOC)

En este ensayo, los resultados obtenidos por HPLC no fueron concluyentes, ya que se detectaron pérdidas elevadas, y no aparecen los compuestos de degradación habituales (ácido acético, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido láctico, ácido butírico, ácido succínico, ácido levulínico y HMF) (62). Con el fin de saber si ha tenido lugar una degradación de los carbohidratos a compuestos orgánicos más simples no detectables con esta técnica, se decidió llevar a cabo un análisis de carbono orgánico total (*Total Organic Carbon, TOC*) de las fases líquidas. Este estudio no se realizó sobre todas las muestras, sino únicamente a aquellas donde la degradación de carbohidratos resultó más elevada, es decir, las muestras de biomasa tratada mediante los métodos NaOH-120 y HCl-120/60 fueron obviadas. Los datos obtenidos se reflejan en la *Tabla 10*:

Experimento	m TOC (mg)	Suma CH + AA (mg)	Recuperación carbohidratos (%)
UAE SD	8.485	538.3314	7.51
UAE D	2.983	0	0.00
UAEE-P SD	29.021	642.9634	7.02
UAEE-P D	2.812	186.48	0.00
UAEE-C SD	7.718	195.8825	19.32
UAEE-C D	1.867	110.1672	13.59
HE-P SD	10.017	375.3408	4.74
HE-P D	0.572	57.7202	0.24
HE-C SD	5.591	180.40725	17.80
HE-C D	1.110	109.2608	13.48
NaOH-60 SD	17.375	1446.087	14.07
NaOH-60 D	11.611	1221.1286	12.52

**Tabla 10.** Valores de TOC (mg) obtenidos para las muestras sin dopar (SD) y dopadas (D) con metales pesados comparados con la suma de las pérdidas de carbohidratos y aminoácidos (mg) generadas en cada experimento y con las recuperaciones de carbohidratos (%) en cada caso.

Los valores del TOC no concuerdan con la suma de las pérdidas de carbohidratos y aminoácidos que se registraron durante el análisis de los experimentos; sin embargo, sí coincidió que los casos en los que las recuperaciones son casi nulas, los valores de TOC también son muy bajos. Una posible causa de estas enormes pérdidas pudo ser que los carbohidratos sufrieron gran degradación como CO<sub>2</sub> gaseoso.

## 4.7. Distribución de los metales en las fases líquidas y sólidas

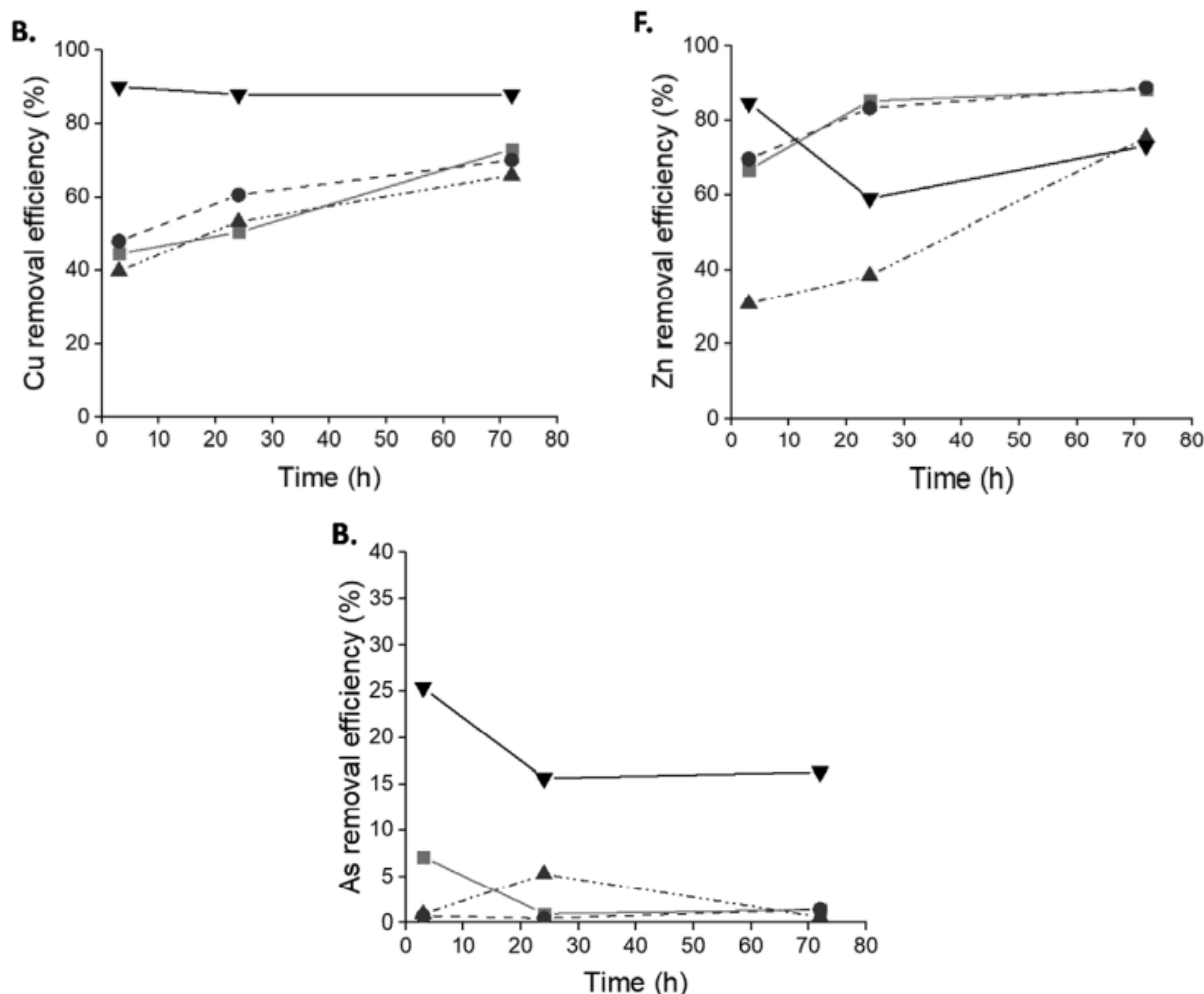
Cada especie de microalga posee una capacidad de adsorción de metales distinta (*biosorption capacity*,  $q_i$ ) y que varía según el metal del que se trate. Esta  $q_i$  se mide en unidades de mg de metal/g biomasa y se calcula como:

$$q_i = V \cdot \frac{C_{i,0} - C_{i,f}}{W_f} \quad \text{Ecuación XII}$$

Donde  $V$  es el volumen de disolución metálica empleado,  $C_{i,0}$  y  $C_{i,f}$  son las concentraciones de metal (mg/L) en la disolución al inicio y el final del experimento, respectivamente, y  $W_f$  es la masa seca final de la biomasa microalgal (63). Este factor está relacionado también con la eficiencia de eliminación del metal (*removal efficiency*, %RE), la cual se calcula mediante la siguiente *Ecuación XIII*:

$$\%RE = \frac{C_{i,0} - C_{i,t}}{C_{i,0}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación XIII}$$

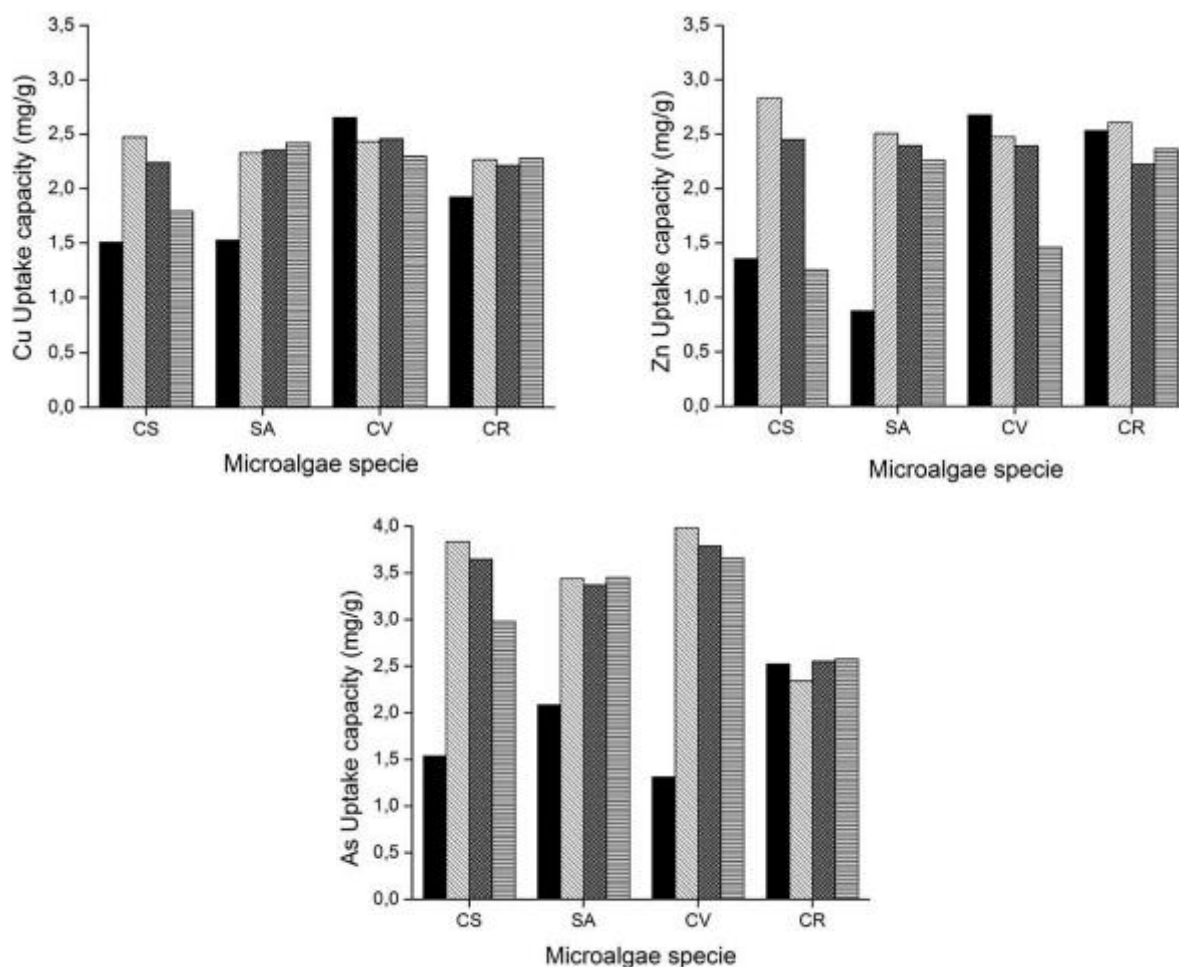
Donde  $C_{i,t}$  es la concentración de metal (mg/L) en el tiempo de medida (63). En este mismo estudio concluyeron que la %RE se incrementaba con el tiempo, al igual que aumentaba el crecimiento de la microalga, y que eran favorables medios de cultivo con alta concentración de TOC y con niveles de pH elevados. A continuación, la *Figura 15* muestra las gráficas de la evolución del %RE para cobre, zinc y arsénico por microalgas de la especie *Scenedesmus almeriensis*.



**Figura 18.** Gráficas de evolución de la eficiencia de eliminación del Cu, Zn y As en estudios de adsorción metálica sin remodelación del CO<sub>2</sub> por *Scenedesmus almeriensis* en soluciones multimetálicas (600 mg/L As, 150 mg/L Cu y Zn) a diferentes concentraciones iniciales de materia orgánica: control (▼), 40 mg/L pentona + 27.5 mg/L extracto de carne (▲), 80 mg/L pentona + 55 mg/L extracto de carne (●), 160 mg/L pentona + 110 mg/L extracto de carne (■). Obtenido de la referencia 63.

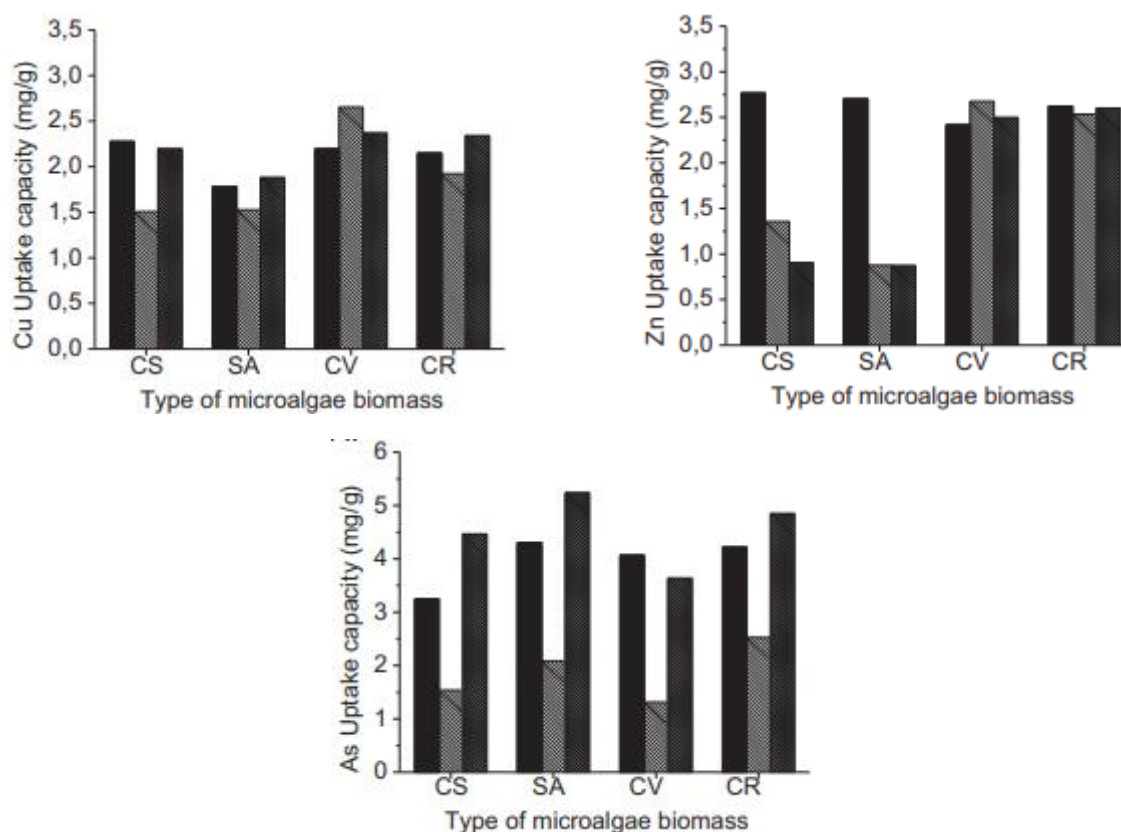
No hubo duda en que el %RE para Cu y Zn aumentaba a medida que pasa el tiempo, produciéndose la mayor parte de la eliminación de metal en las primeras 30 horas del estudio y consiguiendo mejores rendimientos de eliminación para las muestras en las que la concentración de materia orgánica añadida era más alta. Sin embargo, los rendimientos de %RE para el As son mucho más bajos, no llegando a alcanzar el 10% en ningún caso y siempre siendo menores que los de la muestra de control. En este estudio se calculó el %RE de la biomasa con la que se llevaron a cabo todos los análisis de composición bioquímica, obteniendo unas eficiencias de eliminación del 85.5% para Cu, 91.2% para Zn y 72.9% para As.

En la *Figura 16* aparecen las gráficas de los valores de  $q_i$  de cobre y zinc ( $q_{Cu}$  y  $q_{Zn}$ ) obtenidos para diferentes biomazas en función del tiempo que la biomasa estuvo en contacto con la disolución multimetálica utilizada en los experimentos que obtuvo el grupo de investigación del ISP en 2018 (64). Los  $q_{Cu}$  y  $q_{Zn}$  obtenidos para las biomazas tratadas con disoluciones multimetálicas a cualquier tiempo rondaban los 2.5 mg/g y el  $q_{As}$  fue de casi 3.5 mg/g. Esto parecía



**Figura 19.** Gráfica de capacidades de retención (*uptake capacity*, mg/g) a pH 7.0 para el Cu, Zn y As por diferentes especies de microalga en función del tiempo de exposición: disolución monometálica 3h (■), disolución multimetálica 3h (▨), disolución multimetálica 24h (■) y disolución multimetálica 72h (▩). CS: Chlorophyceae spp., SA: *Senedesmus almeriensis*, CV: *Chlorella vulgaris* y CR: *Chlamydomonas reinhardtii*. Adquirido de la referencia 64.

No obstante, las capacidades de adsorción metálica se ven influenciadas por el pH del medio de crecimiento de la biomasa, por lo que es un factor que hay que tener en cuenta. Estudios realizados por el ISP en 2018 analizaron el efecto que ejerce el pH en la adsorción de varios metales, entre ellos el cobre, el zinc y el arsénico (64).



**Figura 20.** Influencia del pH en las capacidades de adsorción metálica de Cu, Zn y As para diferentes biomazas microalgales. pH 5.5 (■), pH 7.0 (▨) y pH 9.5 (▩). CS: Chlorophyceae spp., SA: *Scenedesmus almeriensis*, CV: *Chlorella vulgaris* y CR: *Chlamydomonas reinhardtii*. Gráficas adquiridas de la referencia (64).

Se observó que  $q_{Cu}$  apenas varía con el pH, aunque sí disminuye ligeramente a pH 7.0. No fue así para el resto de los metales. La capacidad de adsorción de Zn se fue fuertemente afectada por el incremento del pH, reduciéndose del 2.7 mg/g a pH 5.5 hasta menos de 1.0 mg/g a pH 7 y 9.5. En el caso del arsénico, por otro lado, la biomasa tan sólo ve reducida su capacidad de adsorción a pH 7.0 y parece que mejora en medios más básicos (64).

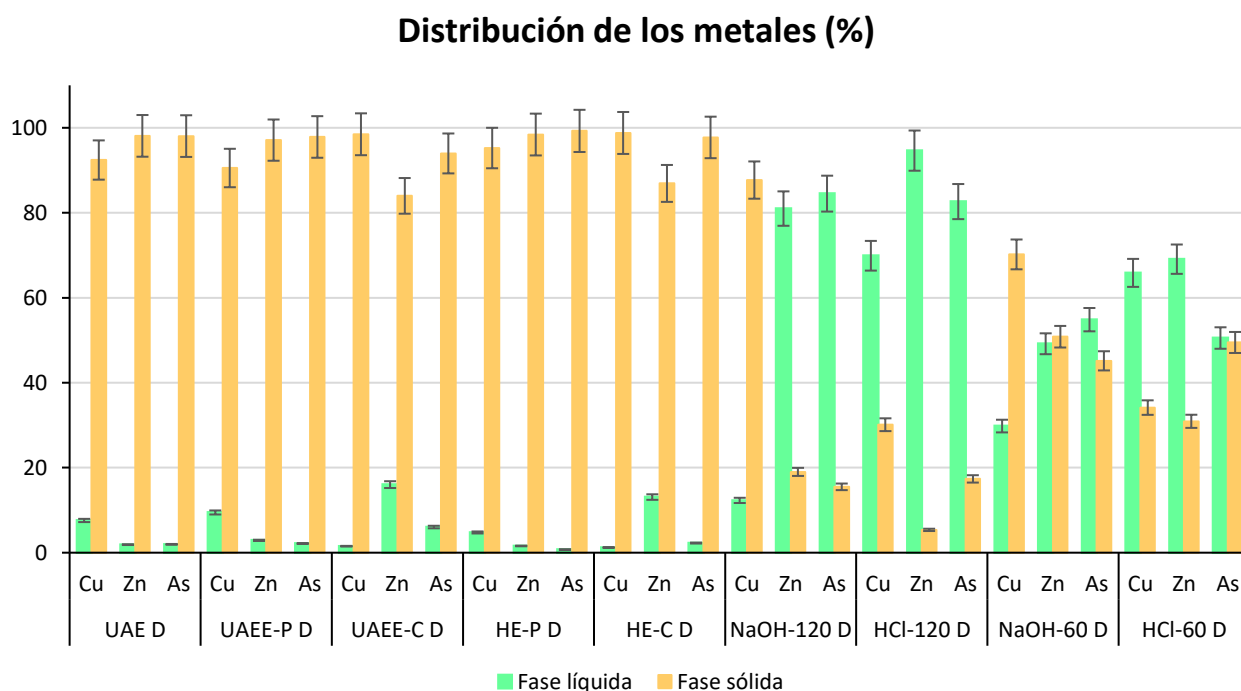
En la *Tabla 11* se comparan los valores de %RE y  $q_i$  calculados en este estudio con los datos bibliográficos encontrados:

Factor	Datos bibliográficos (63,64)			Resultados estudio actual		
	Cu	Zn	As	Cu	Zn	As
%RE	75	87	23	85.52	91.24	72.87
$q_i$ (mg/g)	2.5	2.5	3.5	2.03	1.33	0.002

**Tabla 11.** Comparación de los valores bibliográficos (63,64) de eficiencia de eliminación de metales (%RE) y capacidad de retención ( $q_i$ ) del cobre, el zinc y el arsénico sobre biomasa microalgal de *Scenedesmus almeriensis* con los valores obtenidos en este estudio.

Aunque las magnitudes de %RE no coinciden con los datos bibliográficos sí siguen la misma tendencia: el metal con mayor eficiencia de eliminación es el As, seguido por el Cu y por último el Zn, aunque alcanzando en este caso un rendimiento un 50% más alto del esperado. En cuanto a las capacidades de retención, la del Cu coincidía con la bibliografía y la del Zn, aunque algo menor, también se consideró como correcta. Sin embargo, parece que la biomasa apenas presentó afinidad por el As, ya que  $q_{As}$  es hasta tres órdenes de magnitud inferior a la esperada. No obstante, es posible que esta gran diferencia se deba a que la concentración de As en el medio de crecimiento fue mucho menor que la utilizada en el estudio de 2018 (0.1 mg/L frente a 12 mg/L).

Con los análisis de ICP-OES se pudo determinar también la distribución de cada metal entre las fases líquidas y sólidas en función del método de extracción aplicado a las muestras de biomasa dopada en el actual estudio (Figura 4). Las concentraciones obtenidas para el cobre y el zinc tanto en las fases sólidas como en las líquidas fueron del orden de los mg/L, mientras que para el arsénico fueron de  $\mu\text{g/L}$ .



**Figura 21.** Distribución (%) en las fases sólidas (FS) y líquidas (FL) del cobre (Cu), zinc (Zn) y arsénico (As) en función del tratamiento de extracción al que se ha sometido a la biomasa dopada con metales. Los errores se han calculado como %SD.

Se observó una clara diferencia entre los tratamientos físicos y biológicos (ultrasonidos y enzimáticos) y los tratamientos químicos, ya que para los primeros métodos la mayor parte de los metales quedaron retenidos en la fase sólida, mientras que con los segundos métodos los metales fueron recuperados en la fase líquida. Esto es algo beneficioso ya que el hidrolizado líquido donde se encuentran los péptidos y monosacáridos recuperados de interés no presentan metales que puedan afectar a la posterior separación o uso final de estos productos. Una posible explicación de la diferencia de reparticiones podría ser que ni los ultrasonidos, ni las enzimas ni su aplicación complementaria son capaces de romper las interacciones que existen entre el metal y las paredes de la microalga, por lo que permanecen en la fase sólida residual. Estudios previos permitieron conocer que los complejos proteína-metal sólo se disocian cuando el pH del medio varía, lo cual explica la baja eficiencia de los métodos de ultrasonidos (58).

Para los métodos con ultrasonidos (UAE, UAEE-P y UAEE-C), se observa que la cantidad de metal en la fase líquida es mínima para todos los metales, obteniendo un máximo del 16% para el caso del Zn mediante tratamiento con Celluclast™ (UAEE-C), aunque con este mismo experimento sólo se consigue una recuperación en la fase líquida de Cu y As del 1.5% y 6%, respectivamente. La mayor presencia de cobre en la fase líquida cuando se emplea Protamex™ puede indicar que este metal se presenta formando complejos con las proteínas en la biomasa, y por lo tanto la enzima es capaz de romper los enlaces con las proteínas y liberar del cobre (65). Así mismo, destaca que empleando la enzima Celluclast™, el metal que se recupera en la fase líquida en mayor cantidad es el zinc, lo cual puede indicar que este metal está formando complejos con los carbohidratos de la pared celular. Dado que el pH del medio empleado cada las hidrólisis con cada una de las enzimas es distinto (6.5 para HE-P y 4.8 para HE-C), es posible que este factor influyese en la solubilización de los metales, tal y como se ha mencionado anteriormente.



En cuanto a los métodos químicos, se concluye que influyen tanto la temperatura como el pH del medio y el metal de que se trate en la eficacia de extracción del método, tal y como se concluyó también con estudios previos realizados que utilizaban métodos químicos, entre otros, con la finalidad de eliminar metales pesados de aguas residuales de depuradoras (66). Se obtuvieron altas recuperaciones de metales en fase líquida, siendo mucho mayores a temperaturas de 120°C, ya sea en medio básico (NaOH-120) o ácido (HCl-120), lo cual concuerda con el hecho de que la solubilidad de los metales es mayor cuanto más alta sea la temperatura. En medio básico a 120°C (NaOH-120) se consiguió un 31.8% más de Zn en la fase líquida que a 60°C (NaOH-60) y lo mismo sucedió con el As en un porcentaje del 29.7%. Con este último tratamiento se consiguió la mayor extracción de As, llegando al 84.5% de arsénico en la fase líquida. Por el contrario, en el caso del cobre, la cantidad de éste en la fase líquida es un 17.5% mayor cuando se utilizan temperaturas más bajas. Con los resultados en medio ácido se llegó prácticamente a las mismas conclusiones: a temperaturas elevadas (HCl-120) las cantidades de Zn y As en la fase líquida son, respectivamente, un 25.5% y 32.1% superiores que las conseguidas a 60°C (HCl-60). Pero en esta ocasión, se consigue una mejor extracción de Cu a mayor temperatura, aunque siendo tan sólo un 4% superior que a 60°C y extrayendo únicamente el 69.9% del cobre total. No obstante, este método favoreció la recuperación del Cu, del mismo modo que para el Zn, ya que consiguió liberar un 94.6% del contenido total de zinc en la muestra. Esto es debido a que a pH muy elevados el  $\text{Cu}^{+2}$  puede permanecer formando complejos proteína-metal y el  $\text{Zn}^{+2}$  se encuentra formando complejos muy estables con los carbohidratos, mientras que en medio ácido las sales metálicas se disuelven y pasan a la fase líquida (60,67). Estudios previos demostraron que los tratamientos con medio ácido, tanto con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  o HCl, resultaron ser una buena opción para la eliminación de metales pesados presentes en aguas residuales, consiguiendo en las condiciones óptimas (20% v/v  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 80°C durante 30 min) eliminar el 86% del cobre y el 72% del zinc (66).

Por lo tanto, al seleccionar un proceso de valoración, ha de tenerse en cuenta que los pretratamientos químicos solubilizan los metales pesados, especialmente si se trabaja con HCl a 120°C. Mientras que los tratamientos enzimáticos o con ultrasonidos proporcionan hidrolizados con una baja concentración de metales, quedando éstos retenidos en la fase sólida.

## 5. CONCLUSIONES

---

Los resultados del primer ensayo indicaron diferencias significativas entre las composiciones de carbohidratos, glucosa y xilosa de las biomásas sin dopar y dopada con fármacos veterinarios, la presencia de estos fármacos derivó en una mayor formación de proteínas a costa de los carbohidratos y lípidos. El tipo de enzima empleada en los métodos de extracción por UAEE afecta significativamente a los rendimientos de solubilización y recuperación, tanto de proteínas como de carbohidratos, obteniendo mejores resultados para las proteínas con la enzima Protamex™ y para los carbohidratos con Celluclast™. Se vio que el método de extracción por UAEE-P generó diferencias significativas entre las solubilizaciones de proteína de las biomásas dopada y sin dopar. Los rendimientos de extracción alcanzados con los métodos químicos fueron mejores que los tratamientos más suaves, consiguiendo mayores solubilizaciones de proteína en medio básico y de carbohidratos en medio ácido, siendo siempre significativamente más altos a 120°C que a 60°C. La extracción de proteínas fue significativamente mayor en la biomasa sin dopar que en la dopada con fármacos veterinarios cuando se emplearon métodos básicos a ambas temperaturas de trabajo. Las recuperaciones de aminoácidos llevaron a las mismas conclusiones que las vistas en las solubilizaciones. Las solubilizaciones de glucosa fueron significativamente más bajas para la biomasa dopada cuando se emplearon métodos de extracción en medio NaOH a 60 y 120°C, pero no así para los medios ácidos. No obstante, en la xilosa esta diferencia tan sólo se detectó en medio básico a 60°C, obteniendo buenos resultados para el resto de los tratamientos químicos. Las solubilizaciones de glucosa y xilosa fueron significativas cuando se empleó ultrasonidos e hidrólisis enzimática, siendo muy importante en el caso de la enzima Protamex™, lo que podría indicar que este enzima no fue capaz de romper las interacciones existentes entre la glucosa y los fármacos mientras que la celulasa sí. Sin embargo, las solubilizaciones de glucosa apenas variaron cuando se aplicó UAEE. En el caso de la xilosa, las diferencias significativas de solubilización para ambas biomásas tan sólo se detectaron con ultrasonidos y para el método combinado UAEE-P. Las recuperaciones de glucosa fueron bajas en todos los casos, excepto para la hidrólisis ácida a 120°C para ambos tipos de biomasa y, en menor medida, para la extracción por UAEE-C. Las recuperaciones de xilosa fueron muy bajas, incluso nulas para los tratamientos en pH básico, coincidiendo en que la mejor opción era el medio HCl a 120°C. Se detectaron diferencias significativas para las recuperaciones de xilosa entre ambas biomásas con todos los métodos de extracción, mientras que para la glucosa estas diferencias sólo fueron significativas en los métodos de extracción química.

En el segundo ensayo, la composición global de la biomasa dopada con metales pesados cambia significativamente para los carbohidratos, la glucosa y los lípidos, siendo en todos ellos menor que los observados en la biomasa sin dopar, pero la composición de proteínas y xilosa apenas varía. Esto fue consecuencia del estrés oxidativo generado por la presencia de los metales en el medio de crecimiento de la microalga y de la acumulación de  $Zn^{2+}$ , que modifican la estructura molecular de las proteínas a costa de dañar la composición de lípidos y carbohidratos. La comparación de los rendimientos de solubilización de proteínas en las muestras sin dopar de ambos ensayos mostró diferencias significativas entre las capacidades de extracción conseguidas por UAEE con enzima Celluclast™ y por hidrólisis ácida a 120°C, siendo respectivamente menor y mayor en el primer ensayo que en el segundo. Sin embargo, esta misma comparación en la extracción de carbohidratos mostró grandes diferencias entre ambas biomásas debidas a pérdidas de carbohidratos y al fenómeno de la calima que tuvo lugar durante el cultivo de la microalga. Únicamente fueron comparables cuando se aplicaron ultrasonidos, UAEE con enzima Protamex™, hidrólisis enzimática con Celluclast™ o hidrólisis con HCl a 120°C. No obstante, esta diferencia se explicó al tener en cuenta los porcentajes de retención de carbohidratos, que indicaron resultados comparables para todos los métodos excepto en el caso de la hidrólisis ácida a baja temperatura.

Del mismo modo que en el primer ensayo, las solubilizaciones de proteínas para las biomásas de segundo ensayo fueron mejores al emplear métodos químicos a 120°C y son mayores en pH básico, ya que son los únicos tratamientos capaces de romper las interacciones metal-proteína. Se detectaron diferencias significativas entre las biomásas sin dopar y dopada con metales cuando se emplearon ultrasonidos, UAEE con Protamex™, ambas hidrólisis enzimáticas y para todos los métodos químicos excepto en pH ácido a elevada temperatura. Las recuperaciones de aminoácidos siguieron la misma tendencia, encontrando diferencias significativas para los mismos tratamientos, excepto para medio NaOH a 120°C y HCl a 60°C, para los que las recuperaciones fueron comparables en ambas biomásas. Las solubilizaciones de glucosa fueron muy bajas en todos los tratamientos excepto con HCl a 120°C, ya que fue el único tratamiento capaz de romper los complejos que el  $\text{Cu}^{+2}$  forma con los carbohidratos. Se detectaron diferencias significativas entre las solubilizaciones de glucosa de las biomásas dopada y sin dopar al emplear ultrasonidos, hidrólisis enzimática con Protamex™ e hidrólisis ácida a ambas temperaturas, aunque para estas últimas los rendimientos fueron mayores en la biomasa dopada. Para la xilosa, las extracciones fueron elevadas al aplicar métodos químicos a 120°C, siendo mayor en medio ácido, de tal manera que tan sólo con los métodos de extracción en medio ácido, tanto a 120°C como a 60°C, consiguieron rendimientos comparables para ambas biomásas. En cuanto a los rendimientos de recuperación, fueron siempre inferiores al 20% o nulos, exceptuando el tratamiento con HCl a 120°C tanto para proteínas como para glucosa y xilosa. Para la glucosa se encontraron diferencias significativas entre las recuperaciones para los dos tipos de biomasa con todos los métodos de extracción menos en pH ácido a 120°C y en medio básico a 60°C. En el caso de la xilosa las recuperaciones sólo fueron comprables para HCl a 120°C.

La retención de metales por parte de la biomasa en el segundo ensayo sigue las tendencias descritas en la bibliografía previa, excepto en el caso del As, lo cual suponemos esté relacionado con la baja concentración inicial de arsénico en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos por ICP-OES sobre la distribución de los metales entre las fases sólida y líquida indican que los tratamientos químicos son los únicos capaces de eliminar los metales retenidos en la microalga, mientras que si lo que se desea es un hidrolizado libre de metales la mejor opción sería emplear métodos de ultrasonidos, enzimáticos y combinados.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- (1) Tan, J.S., Lee, Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, W., Ho, S.-H., & Show, P. L. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*. 2020, 11.
- (2) Singh, J., & Saxena, R. C. An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. Diversity and Significance. Handbook of Marine Microalgae: *Biotechnology Advances*. 2015, 11-24.
- (3) Teuling, E., Wierenga, P. A., Schrama, J. W., & Gruppen, H. Comparison of Protein Extracts from Various Unicellular Green Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65 (36), 7989-8002.
- (4) Vale, M.A., Ferreira, A., Pires, J.C.M., & Gonçalves, A.L. Chapter 17 - CO<sub>2</sub> capture using microalgae. *Advances in Carbon Capture*. Woodhead Publishing. 2020, 381-405.
- (5) Borowitzka, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Progress in Industrial Microbiology*. 1999, 35 (C), 313-321.
- (6) Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T., & Yamazawa, A. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *Progress in Industrial Microbiology*. 1999, 35 (C), 33-38.
- (7) Bhatia, S. K., Mehariya, S., Bhatia, R. K., Kumar, M., Pugazhendhi, A., Awasthi, M. K., Atabani, A. E., Kumar, G., Kim, W., Seo, S. O., & Yang, Y. H. Wastewater based microalgal biorefinery for bioenergy production: Progress and challenges. *Science of The Total Environment*. 2021, 751, 141599.
- (8) Xu, Z. et al. Development of integrated culture systems and harvesting methods for improved algal biomass productivity and wastewater resource recovery - A review. *Science of the Total Environment*. 2020, 746, 141039.
- (9) Raheem, A., Prinsen, P., Vuppaladadiyam, A. K., Zhao, M., & Luque, R. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. *Journal of Cleaner Production*. 2018, 181, 42-59.
- (10) Al-Jabri, H., Das, P., Khan, S., Thaher, M., & AbdulQuadir, M. Treatment of Wastewaters by Microalgae and the Potential Applications of the Produced Biomass - A Review. *Water*. 2021, 13, 17.
- (11) Ma, R., Wang, B., Chua, E. T., Zhao, X., Lu, K., Ho, S. H., Shi, X., Liu, L., Xie, Y., Lu, Y., & Chen, J. Comprehensive utilization of marine microalgae for enhanced coproduction of multiple compounds. *Marine Drugs*. 2020, 18 (9), 1-26.
- (12) Becker, E. W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 2007, 25 (2), 207-210.
- (13) Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., & Sukhikh, S. Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. *Biomolecules*. 2020, 10(8), 1-24.
- (14) Choudhary, P., Assemany, P. P., Naaz, F., Bhattacharya, A., Castro, J. de S., Couto, E. de A. do C., Calijuri, M. L., Pant, K. K., & Malik, A. A review of biochemical and thermochemical energy conversion routes of wastewater grown algal biomass. *Science of the Total Environment*. 2020, 726 (271), 137961.
- (15) Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*. 2020, 41 (April), 107545.
- (16) Sutherland, D. L., Howard-Williams, C., Turnbull, M. H., Broady, P. A., & Craggs, R. J. Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high-rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*. 2015, 184, 222-229.
- (17) Zhou, Weizheng, Wang, Z., Xu, J., & Ma, L. Cultivation of microalgae *Chlorella zofingiensis* on municipal wastewater and biogas slurry towards bioenergy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018, 126 (5), 644-648.
- (18) Mehrabadi, A., Craggs, R., & Farid, M. M. Biodiesel production potential of wastewater treatment high rate algal pond biomass. *Bioresource Technology*. 2026, 221, 222-233.
- (19) Passos, F., Hernández-Mariné, M., García, J., & Ferrer, I. Long-term anaerobic digestion of microalgae grown in HRAP for wastewater treatment. Effect of microwave pretreatment. *Water Research*. 2014, 49.
- (20) Al-Jabri, H., Das, P., Khan, S., Thaher, M., & Abdulquadir, M. Treatment of wastewaters by microalgae and the potential applications of the produced biomass—a review. *Water (Switzerland)*. 2021, 13(1).
- (21) Oswald W., Large-scale algal culture systems (engineering aspects), Micro-algal biotechnology (Borowitzka M. A. y Borowitzka L. J.). *Cambridge University Press*. 1998, 357-394.
- (22) Rojo, E.M., Piedra, I., González, A.M., Vega, M., Bolado, S. Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2021, 335, 125256.

- (23) Blanco-Vieites, M., Suárez-Montes, D., Delgado, F., Álvarez-Gil, M., Hernández, A., & Rodríguez, E. Removal of heavy metals and hydrocarbons by microalgae from wastewater in the steel industry. *Algal Research*. 2022, 64, 102700.
- (24) Hölzel, C.S., Muller, C., Harms, K.S., Mikolajewski, S., Schäfer, S., Shwaiger, K., & Bauer, J. Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environmental Research*. 2012, 113, 21-27
- (25) Collao, J., García-Encina, P.A., Blanco, S., Bolado-Rodríguez, S. & Fernández-González, N. Current Concentrations of Zn, Cu, and As in Piggery Wastewater Compromise Nutrient Removals in Microalgae–Bacteria Photobioreactors Due to Altered Microbial Communities. *Biology*. 2022, 11, 1176.
- (26) Sánchez, D.S. Influencia de la deficiencia de nutrientes (C, N, P) en la remoción de diclofenaco por las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* CC137 y CC1731. Tesis doctoral, Universidad Autónoma San Luis Potosí, S. L. P. México. 2021.
- (27) Alonso, C., Bolado, S., & Collao, J. Influencia de los antibióticos sobre el tratamiento de agua residual de purines de cerdo utilizando fotobioreactores. *Trabajo Fin de Máster, Universidad de Valladolid*. 2021.
- (28) Zambrano, J., García-Encina, P.A., Hernández, F., Botero-Coy, A.M., Jiménez, J.J. & Irusta-Mata, R. *Journal of Water Process Engineering*. 2021, 43, 102226.
- (29) Xu, L., Zhang, H., Xiong, P., Zhu, Q., Liao, C., & Jiang, G. Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment*. 2021, 753, 141975.
- (30) Rosas, J.R., Islas, H., & Gómez, L.M. Ocurrencia, destino, detección y efectos tóxicos de quinolonas en ambientes acuáticos. *Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental*. 2021, 18, 540-572.
- (31) Luque, O.M. Depleción del antibiótico sulfadiazina 14C en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis doctoral, Universidad Nacional del Altiplano. 2018.
- (32) Suresh Kumar, K., Dahms, H.U., Won, E.J., Lee, J.S., & Shin, K.H. Microalgae—A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015, 113, 329 - 352.
- (33) Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Biología tropical*. 2005, 53 (3-4), 325-330.
- (34) Naula, L. A., Zúñiga, P. A., & Pauta, G. G. Remoción de metales pesados (cromo, zinc, aluminio, arsénico, níquel y cobre) en aguas industriales utilizando algas coimmobilizadas con alginato de sodio. *Trabajo de titulación, Universidad de Cuenca*. 2021.
- (35) Puris, K. J., & Huamán, A. R. Aplicación de la microalga *Chorella Vulgaris* como alternativa para la bioadsorción de metales pesados Pb, Hg, Cd en aguas. *Trabajo de investigación, Universidad Peruana Unión*. 2019.
- (36) Phong, W. N., Show, P. L., Le, C. F., Tao, Y., Chang, J. S., & Ling, T. C. Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. *Biochemical Engineering Journal*. 2018, 135, 83–90.
- (37) D’Hondt, E., Martín-Juárez, J., Bolado, S., Kasperovicene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K., & Bastiaens, L. Cell disruption technologies. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*. 2017, 133–154.
- (38) Sood, A., Renuka, N., Prasanna, R., & Ahluwalia, S. Phytoremediation. Cyanobacteria as Potential Options for Wastewater Treatment. *Management of Environmental Contaminants, Volume 2*. 2015, 8, 83-94.
- (39) Rojo, E.M., Bolado, S., Filipigh, A., Moldes, D., Vega, M. Potential of Microalgae for Protein Production. *Algal Biorefineries and the Circular Bioeconomy*. 2022, 4, 91-132.
- (40) Martín, J., Martínez-Páramo, S., Maté-González, M., García, P.A., Muñoz, R., & Bolado, S. Evaluation of pretreatments for solubilisation of components and recovery of fermentable monosaccharides from microalgae biomass grown in piggery wastewater. *Chemosphere*. 2021, 268, 129330.
- (41) Filipigh, A. Valorización de un consorcio de microalgas y bacterias: comparación de métodos convencionales y nuevos métodos de extracción asistida. *Universidad de Valladolid*. 2021.
- (42) Lorenzo-Hernando, A., Ruiz-Vegas, J., Vega-Alegre, M., & Bolado-Rodríguez, M. Recovery of proteins from biomass grown in pig manure microalgae-based treatment plants by alkaline hydrolysis and acidic precipitation. *Bioresource Technology*. 2019, 273, 599–607.

- (43) Martin, J., Martínez-Páramo, S., Maté-Gonzales, M., García, P.A., Muñoz, R., & Bolado, S. Evaluation of pretreatments for solubilisation of components and recovery of fermentable monosaccharides from microalgae biomass grown in piggery wastewater. *Chemosphere*. 2021, 268, 129330.
- (44) Callejo-López, J.A., Ramírez, M., Cantero, D., & Bolívar, J. Versatile method to obtain protein- and/or amino acid-enriched extracts from fresh biomass of recalcitrant microalgae without mechanical pretreatment. *Algal Research*. 2020, 50, 102010.
- (45) Wen, L., Zhang, Z., Sun, D.-W., Periaswamy, S. & Tiwari, B.K. Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020, 60:11, 1826-1841.
- (46) Hilderbrand, G., Poojary, M. M.; O'Donnell, C., Lund, M. N., García-Vaquero, M., & Tiwari, B.K. Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*. 2020, 32, 1709–1718.
- (47) Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, Z., Liu, C., Sun, C, Zhang, W., & Marhaba, T. pH Effect on Heavy Metal Release from a Polluted Sediment. *Journal of Chemistry*. 2018, 7597640.
- (48) Lee, J., Choi, O. K., Oh, D., Lee, K., Park, K. Y. & Kim, D. Stimulation of Lipid Extraction Efficiency from Sewage Sludge for Biodiesel Production through Hydrothermal Pretreatment. *Energies*. 2020, 13, 6392.
- (49) Rojo, E.M., Filipigh, A.A., Bolado, S. Protein solubilization and recovery from microalgal-bacterial consortium: comparison of chemical and novel assisted extraction methods.
- (50) Rojo, E.M., Piedra, I., González, A. M., Vega, M., Bolado, S. Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2021, 335.
- (51) Mellado, N.P. Mejoramiento de evaluación sensorial de concentrados proteicos de co-productos de la industria salmonicultora chilena, por medio de la optimización de los parámetros involucrados en el proceso de hidrólisis enzimática. *Memoria para optar al título profesional de Bioquímico, Universidad de Chile*. 2011, pág. 36.
- (52) Sifuentes-Penagos, G. et al. Hidrólisis de las proteínas de anchoveta (*Engraulis ringens*) entera por acción de la enzima Protamex™. *Scientia Agroprecuaria*. 2018, 9, 1.
- (53) Rosgaard, L. et al. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated Barley 61traw substrates. *Biotechnology Progress*. 2007, 23 (6), págs. 1270-1276.
- (54) Rempel, A., Nadal, G., Farezin, A.C., Pedó, J., Treichel, H., & Colla, L.M. Cultivation of Microalgae in Media Added of Emergent Pollutants and Effect on Growth, Chemical Composition, and Use of Biomass to Enzymatic Hydrolysis. *BioEnergy Research*. 2021, 14, 265-277.
- (55) Wang, Y., Li, J., Lei, Y., Li, X., Nagarajan, D., Lee, D.-J., & Chang, J-S. Bioremediation of sulfonamides by a microalgae-bacteria consortium – Analysis of pollutants removal efficiency, cellular composition, and bacterial community. *Bioresource Technology*. 2022, 351, 126964.
- (56) Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B.N., Munjal, A.K., Baunthiyal, M., & Sharma, V. Metal Toxicity and Photosynthesis. *Photosynthesis: Overviews on Recent Progress & Future Perspective*. 2011, 16, 229-236.
- (57) Zhou, T., Wang, J., Zheng, H., Wu, X., Wang, Y., Liu, M., Xiang, S., Cao, L., Ruan, R., & Liu, Y. Characterization of additional zinc ions on the growth, biochemical composition and photosynthetic performance from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*. 2018, 269, 285-291.
- (58) Nguyen, A., & Moini, M. Analysis of Major Protein-Protein and Protein-Metal Complexes of Erythrocytes Directly from Cell Lysate Utilizing Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2008, 80, 7169–7173.
- (59) Maret, W. Inhibitory zinc sites in enzymes. *Biometals*. 2013, 26, 197-204.
- (60) Aleeskev, Y.E., Garnovzkii, A.D., & Zhdanov, Y.A. Complexes of natural carbohydrates with metal cations. *Russ. Chem. Rev.* 1998, 67, 649.
- (61) Romero, R.E. Adsorción de cobre y zinc utilizando el mesocarpo fibroso de la cáscara de coco verde (*Cocos Nucifera*) en efluentes ácidos de mina. *Universidad Nacional del Centro del Perú*. 2020.
- (62) González, J. Treatment effect on degradation compounds production of microalgal-bacterial biomass grown in photobioreactors for pig manure remediation. *Universidad de Valladolid*. 2021.
- (63) Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M.E., & Bolado, S. Influence of organic matter and CO<sub>2</sub> supply on bioremediation of heavy metals by *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus almeriensis* in a multimetallic matrix. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019, 182, 109393.

- (64) Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M.E., Vega, M., & Bolado, S. Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresource Technology*. 2018, 263, 49–57.
- (65) Omote, J.R. Optimización de la extracción y caracterización de las proteínas solubles del concentrado de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Tesis doctoral, Universidad Nacional Agraria La Molina*. 2019.
- (66) Geng, H., Xu, Y., Zheng, L., Gong, H., Dai, L., & Dai, X. An overview of removing heavy metals from sewage sludge: Achievements and perspectives. *Environmental Pollution*. 2020, 266, 115375.