



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Evaluación del proceso de oxidación hidrotermal con peróxido como alternativa de tratamiento de la fase acuosa resultante de la licuefacción hidrotermal de microalgas**

**Johan Andrés Pasos Panqueva**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental  
Bogotá D.C., Colombia  
2021



# **Evaluación del proceso de oxidación hidrotermal con peróxido como alternativa de tratamiento de la fase acuosa resultante de la licuefacción hidrotermal de microalgas**

**Johan Andrés Pasos Panqueva**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magíster en Ingeniería – Ingeniería Química**

Director:

Ing. Qco., M.Sc., Ph.D. Rubén Darío Godoy Silva

Co-Director:

Ing. Qco., M.Sc., Ph.D. Luis Ignacio Rodríguez Varela

Línea de Investigación:

Bioprocesos – Procesos Termoquímicos

Grupo de Investigación:

Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental  
Bogotá D.C., Colombia  
2021



*Dedicado a:*

*A mi familia, por su amor incondicional, apoyo constante y dedicación.*

## Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

**Johan Andrés Pasos Panqueva**

Fecha: 08 abril 2021

## Agradecimientos

Al Dr. Rubén Darío Godoy Silva, del Departamento de Ingeniería Química Ambiental, por brindarme la posibilidad de trabajar bajo su supervisión y confiar en mi para llevar a cabo este trabajo. Gracias por las enseñanzas, el apoyo desinteresado y las oportunidades brindadas para el desarrollo de mi carrera profesional.

Al Dr. Luis Ignacio Rodríguez Varela, del Departamento de Ingeniería Química Ambiental, por su valioso aporte académico, paciencia y constancia con el trabajo desarrollado sin el cual no hubiera podido ser posible llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Luis Carlos Montenegro Ruiz, del Departamento de Biología, por su guía, apoyo y consejo en los temas relacionados con el cultivo de microalgas.

A la Dra. Yazmín Yaneth Agámez Pertuz, del Departamento de Química por guiar y permitir el desarrollo de las licuefacciones hidrotermales y el tratamiento de la fase acuosa en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Combustibles y Carbones.

A los profesores Mario Enrique Velásquez Lozano, Juan Carlos Serrato Bermúdez, Álvaro Orjuela Londoño, Hugo Ricardo Zea Ramírez y Martha Cristina Bustos López, por su oportuno consejo y colaboración.

A la Dra. Alejandra Palomino Martínez por brindarme consejo y compañía en cada una de las etapas de este trabajo.

A la Universidad Nacional de Colombia y al departamento de Ingeniería Química y Ambiental por ser mi hogar por más de diez años, por brindarme un espacio de aprendizaje y darme la oportunidad de conocer personas valiosas.

A todos los miembros del Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos, por su ayuda, buena disposición y permanente alegría. A Javier, Brenda y Leslie por su apoyo, compañía y valiosa amistad a lo largo de este tiempo. A Ana Isabel por siempre brindar un sabio consejo en el momento adecuado. A Astrid, Cindy, Elizabeth, Diego, Fabian, Mateo, Juliana, Lorena y Andrés por su amistad y colaboración en diferentes etapas del proyecto.

A todo el personal técnico de los Laboratorio de Ingeniería Química, del Laboratorio de Cultivo de Algas, del Laboratorio de Ingeniería Ambiental y del Laboratorio de Carbones y Combustibles por su apoyo.

Finalmente, a mi familia por su paciencia y ser mi más grande apoyo. Sin ellos, no hubiese sido posible finalizar este trabajo.

## Resumen

Múltiples estudios presentan las microalgas como la fuente de biocombustibles más prometedora, debido a que, entre otras características, son 50 veces más eficientes en convertir la luz solar en biomasa y capturan entre 10 y 50 veces más CO<sub>2</sub> que las plantas terrestres. Debido a que el contenido de agua de estos microorganismos puede alcanzar más del 95% en peso, la licuefacción hidrotermal (LHT), que emplea agua a condiciones supercríticas, se ha perfilado como la mejor manera para convertir la biomasa húmeda de microalga en biocrudo. Sin embargo, el rendimiento del proceso para producir biocrudo no supera el 50%, por lo que la generación de una fase acuosa (subproducto de la LHT) constituye el principal residuo del proceso. El presente trabajo pretende evaluar otro proceso hidrotermal, denominado oxidación hidrotermal con peróxido, como alternativa de tratamiento de la fase acuosa proveniente de la LHT de la microalga *Chlorella vulgaris*. En primer lugar, se obtuvo la biomasa algal a licuar, se caracterizó bioquímicamente y se realizó la licuefacción hidrotermal, determinando los rendimientos de producción de cada una de las fases a condiciones constantes de reacción (375°C y 15 minutos de reacción). Posteriormente se caracterizó la fase acuosa obtenida y se diseñó un plan de experimentos que permita establecer las condiciones de reacción adecuadas (tiempo y relación molar de peróxido) que maximicen la producción de fase acuosa tratada. Finalmente, se caracterizó la fase acuosa tratada y se realizaron cultivos comparativos de la microalga en diferentes diluciones de fase acuosa, con el fin de cuantificar el crecimiento algal y evaluar el potencial de recirculación del agua tratada por medio de la oxidación hidrotermal con peróxido. Con el desarrollo de este trabajo se demostró que es viable tratar la fase acuosa de la LHT, para recircular agua y recuperar nutrientes; con lo cual, se mejora la sostenibilidad ambiental y energética de la producción de biocrudo a partir de algas.

**Palabras clave:** Microalga, *Chlorella vulgaris*, licuefacción hidrotermal, gasificación hidrotermal, reciclaje de nutrientes.

## Abstract

Multiple studies present microalgae as the most promising source of biofuels, due to the fact that, among other characteristics, they are 50 times more efficient in converting sunlight into biomass and capture between 10 and 50 times more CO<sub>2</sub> than terrestrial plants. Because the water content of these microorganisms can reach more than 95% by weight, hydrothermal liquefaction (LHT), which uses water at supercritical conditions, has emerged as the best way to convert wet microalgae biomass to biocrude. However, the yield of the process to produce biocrude does not exceed 50%, so the generation of an aqueous phase (by-product of the LHT) constitutes the main waste of the process. The present work aims to evaluate another hydrothermal process, called hydrothermal oxidation with peroxide, as an alternative for treating the aqueous phase from the LHT of the microalgae *Chlorella vulgaris*. First, the algal biomass to be liquefied was obtained, it was biochemically characterized and hydrothermal liquefaction was carried out, determining the production yields of each of the phases at constant reaction conditions (375°C and 15 minutes of reaction). Subsequently, the aqueous phase obtained was characterized and an experiment plan was designed to establish the appropriate reaction conditions (time and molar ratio of peroxide) that maximize the production of the treated aqueous phase. Finally, the treated aqueous phase was characterized and comparative cultures of the microalgae were carried out in different dilutions of the aqueous phase, in order to quantify the algal growth and evaluate the recirculation potential of the treated water by means of hydrothermal oxidation with peroxide. With the development of this work it was demonstrated that it is feasible to treat the aqueous phase of the LHT, to recirculate water and recover nutrients; with which, the environmental and energy sustainability of the production of biocrude from algae is improved.

**Keywords:** Microalgae, *Chlorella vulgaris*, hydrothermal liquefaction, hydrothermal gasification, nutrient recycling.

# Contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Residuos acuosos de procesos hidrotermales de producción de biocombustibles a partir de microalgas .....</b>	<b>7</b>
1.1    Introducción.....	7
1.2    Biocombustibles a partir de microalgas .....	9
1.3    Métodos de obtención de biocombustibles .....	13
1.4    Licuefacción hidrotermal.....	16
1.5    Residuo acuoso de la licuefacción hidrotermal.....	18
1.5.1    pH de la fase acuosa .....	20
1.5.2    Carbono.....	20
1.5.3    Nitrógeno .....	21
1.5.4    Fósforo .....	22
1.5.5    Otras características.....	23
<b>2. Licuefacción hidrotermal de microalgas para la producción de biocrudo .....</b>	<b>24</b>
2.1    Introducción.....	24
2.2    Materiales y métodos .....	28
2.2.1    Mantenimiento y producción de biomasa algal .....	28
2.2.2    Caracterización de la biomasa.....	30
2.2.3    Sistema de reacción para Licuefacción Hidrotermal .....	31
2.2.4    Separación de las fases resultantes de la LHT .....	33
2.3    Resultados y Análisis .....	34
2.3.1    Cinéticas de crecimiento.....	34
2.3.2    Caracterización de la microalga <i>C. vulgaris</i> UTEX 2714.....	36
2.3.3    Licuefacción hidrotermal de microalgas .....	41
2.3.4    Caracterización del biocrudo.....	43
2.3.5    Caracterización de la fase acuosa .....	44
2.4    Conclusiones.....	46

<b>3. Oxidación hidrotermal con peróxido de hidrógeno de la fase acuosa resultante de la LHT de microalgas .....</b>	<b>48</b>
3.1 Introducción .....	49
3.2 Materiales y métodos .....	56
3.2.1 Caracterización de la fase acuosa .....	56
3.2.2 Oxidación hidrotermal con peróxido – Sistema de reacción .....	57
3.2.3 Diseño de experimentos y análisis estadístico .....	58
3.3 Resultados y análisis .....	60
3.3.1 Reducción de color .....	60
3.3.2 Contenido de materia orgánica .....	63
3.3.3 Especies de nitrógeno .....	68
3.3.4 Fósforo soluble .....	73
3.3.5 Compuestos fenólicos .....	75
3.3.6 Optimización de variables .....	77
3.4 Conclusiones .....	79
<b>4. Recirculación y valorización de la fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de la microalga <i>C. vulgaris</i> .....</b>	<b>81</b>
4.1 Introducción .....	81
4.1.1 Recirculación como medio reactivo de la LHT .....	83
4.1.2 Recirculación como medio de cultivo de microalgas .....	84
4.2 Materiales y métodos .....	85
4.2.1 Condiciones de cultivo .....	85
4.2.2 Diseño experimental .....	86
4.2.3 Efecto del factor de dilución sobre la velocidad específica de crecimiento .....	87
4.2.4 Análisis energético .....	88
4.3 Resultados y análisis .....	90
4.3.1 Análisis comparativo de crecimiento .....	90
4.3.2 Máxima dilución de recirculación .....	95
4.3.3 Integración energética del tratamiento hidrotermal de la fase acuosa resultante de la LHT .....	97
4.4 Conclusiones .....	100
<b>5. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>102</b>
5.1 Conclusiones .....	102
5.2 Recomendaciones .....	103
<b>Anexos .....</b>	<b>105</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>147</b>

## Lista de figuras

<i>Figura 1-1. Demanda energética global y fuentes energéticas de los sectores industrial, doméstico y comercial y de transporte</i> .....	2
<i>Figura 1-1. Sistemas abiertos para el cultivo de microalgas.</i> .....	10
<i>Figura 1-2. Sistemas cerrados para el cultivo de microalgas</i>	11
<i>Figura 1-3. Representación de los biocombustibles que se pueden obtener a partir de microalgas</i> .....	12
<i>Figura 1-4. Propiedades de la fase acuosa derivada de la licuefacción hidrotermal de microalgas.</i> .....	19
<i>Figura 2-1. Registro histórico de publicaciones en Web of Science sobre licuefacción hidrotermal.</i> .....	25
<i>Figura 2-2. Esquema del tren de inóculo para el cultivo de la microalga Chlorella vulgaris UTEX 2714.</i> .....	29
<i>Figura 2-3. Reactor tipo autoclave para reacciones de licuefacción hidrotermal.</i> .....	32
<i>Figura 2-4. Cinéticas de crecimiento de la microalga Chlorella vulgaris UTEX 2714.</i> .....	34
<i>Figura 2-5. Cinéticas de rompimiento por ultrasonación de la microalga Chlorella vulgaris UTEX 2714.</i> .....	38
<i>Figura 2-6. Morfología y análisis elemental de la microalga Chlorella vulgaris UTEX 2714.</i> .....	39
<i>Figura 2-7. Productos de reacción de la licuefacción hidrotermal de la microalga Chlorella vulgaris.</i> .....	42
<i>Figura 3-1. Diagrama de flujo de los diferentes procesos que pueden ser empleados para el tratamiento de aguas urbanas e industriales.</i> .....	50
<i>Figura 3-2. Reactor de alta presión para reacciones de oxidación hidrotermal con peróxido.</i> .....	57
<i>Figura 3-3. Diseño factorial compuesto de dos factores con dos niveles.</i> .....	59
<i>Figura 3-4. Variación del color de la fase acuosa durante la oxidación hidrotermal con peróxido.</i> .....	61
<i>Figura 3-5. Efecto del tiempo de reacción y la relación molar de peróxido (<math>\emptyset</math>) sobre la concentración de materia orgánica oxidable y carbono orgánico en la fase acuosa de la LHT de microalgas.</i> .....	64

<i>Figura 3-6. Remoción de materia orgánica y de carbono durante la oxidación hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de microalgas...</i>	65
<i>Figura 3-7. Efecto del tiempo de reacción y la relación molar de peróxido sobre la concentración de las especies de nitrógeno presentes en la fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de microalgas.....</i>	69
<i>Figura 3-8. Remoción de nitrógeno total y sus especies durante la oxidación hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de microalgas...</i>	71
<i>Figura 3-9. Efecto del tiempo de reacción y la relación molar de peróxido sobre la concentración de fosfato en la fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de microalgas. ....</i>	73
<i>Figura 3-10. Remoción de fosfato durante la oxidación hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de microalgas. ....</i>	74
<i>Figura 3-11. Efecto del tiempo de reacción y la relación molar de peróxido sobre la concentración de fenoles en la fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de microalgas. ....</i>	75
<i>Figura 3-12. Remoción de fenoles durante la oxidación hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de microalgas. ....</i>	76
<i>Figura 4-1. Esquema de las metodologías más estudiadas para valorizar la fase acuosa de la LHT. ....</i>	83
<i>Figura 4-2. Cultivos comparativos de la microalga C. vulgaris en la fase acuosa resultante de la LHT antes y después del tratamiento de oxidación hidrotermal con peróxido.....</i>	91
<i>Figura 4-3. Coloración resultante de los cultivos comparativos de la microalga C. vulgaris en medio de cultivo BBM suplementado con fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de la misma microalga. ....</i>	92
<i>Figura 4-4. Efecto de la fase acuosa tratada de la LHT sobre la velocidad específica de crecimiento de la microalga Chlorella vulgaris UTEX 2714. ....</i>	95
<i>Figura 4-5. Análisis energético del proceso de producción de biocrudo integrado con el tratamiento hidrotermal con peróxido de la fase acuosa resultante.....</i>	98

## Lista de tablas

Tabla I-1. Composición química característica de la fase acuosa proveniente de la LHT de microalgas, comparada con los límites máximos permitidos en vertimientos según la legislación colombiana .....	4
Tabla 1-1. Características de diferentes métodos de cultivo de microalgas.....	9
Tabla 1-2. Procesos termoquímicos de conversión de microalgas en biocombustibles ..	14
Tabla 1-3. Procesos térmicos húmedos de conversión de microalgas en biocombustibles. ....	15
Tabla 2-1. Análisis proximal de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714* .....	36
Tabla 2-2. Composición elemental calculada y reportada para la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	40
Tabla 2-3. Rendimiento de productos de la LHT respecto a la biomasa algal alimentada al reactor .....	42
Tabla 2-4. Caracterización de la fase acuosa resultante la LHT de la microalga <i>C. vulgaris</i> UTEX 2714.....	45
Tabla 3-1. Principales características de la oxidación por vía húmeda y en agua supercrítica para el tratamiento de aguas residuales.....	53
Tabla 3-2. Condiciones de reacción para cada tratamiento planteado de la fase acuosa de la LHT.....	60
Tabla 3-3. Condiciones de operación óptimas para el tratamiento hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714.....	78
Tabla 4-1. Proporción de fase acuosa y medio BBM para los cultivos comparativos de crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 2714.....	86
Tabla 4-2. Inventario de datos para la integración energética de la oxidación hidrotermal con peróxido con la LHT de microalgas.....	88
Tabla 5-1. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración.....	145

## Lista de Símbolos y abreviaturas

BBM	Medio basal de Bold ( <i>Bold's basal medium</i> )
COT	Carbono orgánico total, ppm
DCM	Diclorometano
CLD	Detector de quimioluminiscencia ( <i>Chemiluminescence detector</i> )
DQO	Demanda química de oxígeno, ppm
EDS	Espectroscopia de rayos X por energía dispersiva
FA	Fase acuosa
FA <sub>t</sub>	Fase acuosa tratada
LHT	Licuefacción hidrotermal
LO	Luz : Oscuridad
NDIR	Sensor infrarrojo dispersivo ( <i>Nondispersive infrared sensor</i> )
NH <sub>4</sub> -N	Amonio expresado como nitrógeno, mg N L <sup>-1</sup>
NO <sub>2</sub> -N	Nitrito expresado como nitrógeno, mg N L <sup>-1</sup>
NO <sub>3</sub> -N	Nitrato expresado como nitrógeno, mg N L <sup>-1</sup>
N <sub>org</sub>	Nitrógeno orgánico expresado como nitrógeno, mg N L <sup>-1</sup>
NT	Nitrógeno total, mg N L <sup>-1</sup>
ODS	Objetivo de desarrollo sostenible
OHP	Oxidación hidrotermal con peróxido
PBR	Fotobiorreactor ( <i>Photobioreactor</i> )
PCS	Poder calorífico superior, MJ k <sup>-1</sup>
PO <sub>4</sub> -P	Fosfato expresado como fósforo, mg P L <sup>-1</sup>
ps	Peso seco
PT	Fósforo total, mg P L <sup>-1</sup>
RC	Recuperación de carbono, %

---

SEM	Microscopia electrónica de barrido ( <i>Scanning electron microscope</i> )
SCWO	Oxidación en agua supercrítica ( <i>Supercritical water oxidation</i> )
STD	Sólidos totales disueltos, ppm
UTEX	Universidad de Texas
v.v.m	Volumen de aire por volumen de líquido por minuto
WPO	Oxidación húmeda con peróxido ( <i>Wet peroxide oxidation</i> )
Y	Rendimiento
Ø	Relación molar de peróxido
μ	Velocidad específica de crecimiento
%p/p	Porcentaje peso - peso



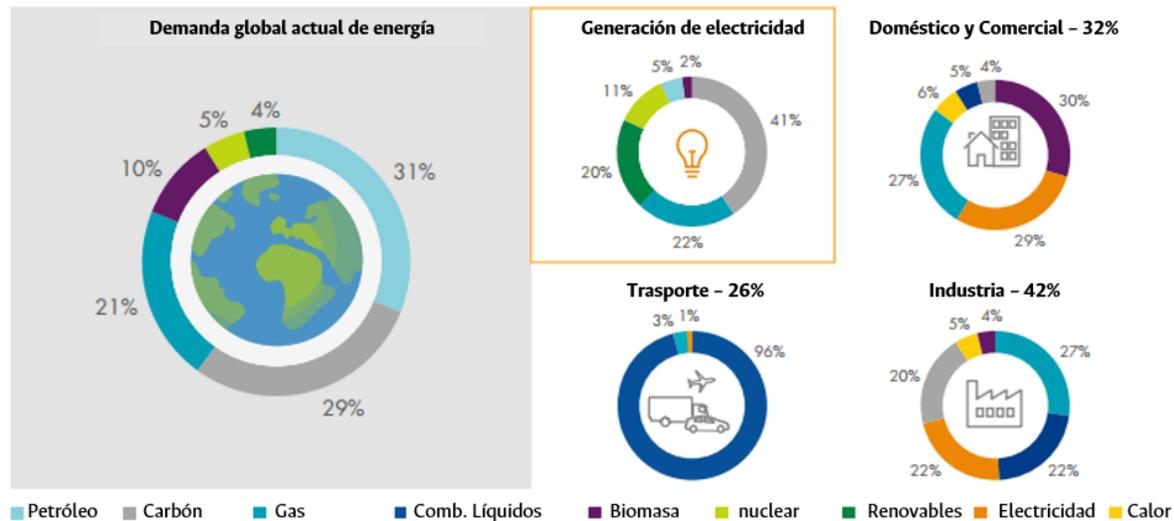
# Introducción

Desde la revolución industrial, los procesos industriales han requerido un consumo energético cada vez mayor debido al aumento de la capacidad de producción de las empresas. Durante mucho tiempo, se dejaron de lado los efectos negativos de la explotación energética sobre el medio ambiente y no fue sino hasta principios del siglo XXI que la humanidad se preocupó por desarrollar procesos más limpios y crear acuerdos y compromisos en pro del ambiente (UPME & BID, 2015).

Las tecnologías actuales están fuertemente basadas en el uso de combustibles de origen fósil, los cuales además de ser un recurso limitado, inciden directamente en las emisiones globales de dióxido de carbono. Se estima que entre 2015 y 2040 debido al aumento de la población y de la calidad de vida, la demanda de energía primaria se incrementará en un 30%, implicando un mayor uso de energías de origen fósil (Hon & Costa, 2016). Más de la mitad de la demanda primaria de energía es suministrada por el uso de petróleo y carbón, como se puede apreciar en la figura 1. Los principales sectores que demandan energía primaria son el industrial (42%), el doméstico y comercial (32%) y el sector de transporte (26%). Este último, está casi exclusivamente basado en el uso de combustibles líquidos provenientes del procesamiento y refinación del petróleo.

No obstante, la disminución de las reservas de petróleo, así como la dinámica del precio de los combustibles fósiles, la creciente demanda energética y las preocupaciones medioambientales, han motivado el desarrollo de nuevos métodos y tecnologías para obtener combustibles a partir de fuentes renovables. Los biocombustibles, como se denomina a este tipo de combustibles, pueden ser producidos a partir de cultivos agrícolas (biocombustibles de 1ª generación), de material lignocelulósico (de 2ª generación), de

microalgas (de 3<sup>a</sup> generación) e incluso a partir de microorganismos modificados genéticamente para capturar CO<sub>2</sub> (de 4<sup>a</sup> generación).



**Figura I-1. Demanda energética global y fuentes energéticas de los sectores industrial, doméstico y comercial y de transporte.**

*Adaptado del Reporte de Sostenibilidad Shell 2016 (Hon & Costa, 2016)*

Recientemente, las microalgas han sido empleadas como materia prima para la producción de biocombustibles, debido a que tienen una alta productividad, necesidades de crecimiento simples (agua, luz, fuente de carbono y nutrientes) (López Barreiro et al., 2013b), y sus principales constituyentes son proteínas, carbohidratos y lípidos. La mayoría de procesos establecidos para producir biocombustibles a partir de microalgas, se basan en la producción y extracción de lípidos, con el fin de producir biodiesel a través de una transesterificación (Brennan & Owende, 2010; El-Shimi et al., 2013; Suali & Sarbatly, 2012). Sin embargo, este proceso requiere biomasa seca, con altos contenidos de lípidos (mayores que el 80% en peso seco) y rendimientos de conversión mayores que el 90% con el fin de que el proceso sea rentable.

El secado de la microalga se convierte entonces, en el cuello de botella de los procesos de producción de biodiesel, debido a que, en promedio, las microalgas tienen una humedad superior al 95% (Brennan & Owende, 2010). Por este motivo, las microalgas se han sometido a procesos de conversión térmicos, que emplean agua, y que permiten obtener productos de mayor interés. Uno de los procesos térmicos más estudiados ha sido la

licuefacción hidrotermal, LHT (o HTL, por sus siglas en inglés *HydroThermal Liquefaction*), que consiste en calentar y presurizar un lodo acuoso de biomasa hasta condiciones cercanas al punto crítico del agua (374°C, 218 atm). El propósito de este proceso es convertir la biomasa en un líquido oleoso oscuro, similar al petróleo, denominado biocrudo, simulando el proceso natural de formación de petróleo (López Barreiro et al., 2013b).

Aunque el objetivo de la licuefacción hidrotermal es transformar en lo posible todos los componentes de las microalgas en biocrudo, durante el proceso se generan otras tres fases (sólida, acuosa y gaseosa) con potencial para ser recirculadas en diferentes etapas del proceso de cultivo o licuefacción de las microalgas (López Barreiro et al., 2013b). La fase acuosa es la de mayor interés para tal fin, debido a que en ésta se encuentran presentes algunos nutrientes esenciales para el crecimiento de la microalga (nitrógeno y fósforo). Por ello, diversos autores han evaluado el potencial de recirculación del subproducto acuoso, encontrando que este se debe diluir al menos 500 veces, debido a la presencia de compuestos fenólicos que, en altas concentraciones, inhiben el crecimiento de las microalgas (T. M. Brown et al., 2010; Garcia Alba et al., 2012; Jena, Das, et al., 2011).

La dilución de la fase acuosa genera que la relación de nutrientes presentes en ella sea menor a la requerida por los microorganismos, por lo que es necesario suplementar el medio de cultivo con sales necesarias para el correcto crecimiento de las microalgas. Igualmente, grandes factores de dilución implican menos cantidad de fase acuosa que pueda ser recirculada, y por consiguiente, la mayoría de la fase acuosa proveniente de la licuefacción hidrotermal de microalgas es desechada (López Barreiro et al., 2013b). Con el fin de evitar problemas de eutrofización y cumplir la normatividad Colombia sobre límites máximos de sustancias en vertimientos (Resolución 631 de 2015 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible) es necesario tratar el agua residual generada en el proceso, pues según lo reportado por diversos autores, la carga contaminante de esta sobrepasa los límites máximos permitidos (Tabla I-1).

A pesar de que el tratamiento del agua residual del proceso de LHT es obligatorio, su manejo en lagunas de tratamiento anaeróbicas es complicado debido a que los microorganismos requieren de un balance adecuado de nutrientes, con el fin de reproducirse a la vez que descomponen el material orgánico presente en el desecho. Un correcto

desarrollo de los microorganismos se presenta cuando la relación C/N oscila entre 20 y 30 (Fricke et al., 2007). Para los ejemplos mostrados, en el mejor de los casos la relación C/N alcanza el valor de 2.7. Por otra parte, concentraciones de amonio superiores a 4000 ppm inhiben el crecimiento de los microorganismos, provocando la mineralización de los lodos y baja eficiencia en el tratamiento del afluente (Fricke et al., 2007).

**Tabla I-1. Composición química característica de la fase acuosa proveniente de la LHT de microalgas, comparada con los límites máximos permitidos en vertimientos según la legislación colombiana**

AUTOR	(Garcia et al., 2013)	(P. Biller & Ross, 2011)	(Cherad et al., 2016a)	(López Barreiro, Bauer, et al., 2015)	(P. Biller et al., 2012)	Límites máximos permitidos en vertimientos según Resolución 631 de 2015 <sup>a</sup> (Resolución 631-2015, 2015)
<b>Microalga</b>	<i>Desmodesmus sp.</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	
<b>Condiciones de HTL</b>	300°C, 5 min, 8% sólidos	350°C, 1h, 10% sólidos	350°C, 30 min, 10% sólidos	150°C, 15 min, 10% sólidos	350°C, 1h, 10% sólidos	
<b>PARÁMETRO (ppm)</b>						
<b>Nitrógeno total (NTK)</b>	1964	6636	-	4901	6888	10
<b>Amonio (NH<sub>4</sub>-N)</b>	2012	5673	12339	4509	5924	N/A
<b>Nitratos (NO<sub>3</sub>-N)</b>	70	329	18	-	237	N/A
<b>Fósforo total</b>	-	-	-	-	-	N/A
<b>Fosfatos</b>	159	3109	3877	3393	1121	N/A
<b>Fenoles</b>	58	108		36.2	158	0.2
<b>Potasio</b>	1290	1460	511	1428	1419	N/A
<b>Carbono Orgánico Total (COT)</b>	-	11373	10843	13259	13764	58 <sup>b</sup>
<b>Acetato</b>	3946	-	8600	742.2	5378	N/A

ppm = partes por millón, N/A = No hay límite establecido en la Resolución. Se debe analizar y reportar el valor encontrado

<sup>a</sup> Datos límites para el sector de 'Actividades de hidrocarburos', en el área de producción.

<sup>b</sup> Carbono Orgánico Total (COT, g·L<sup>-1</sup>) calculado a partir de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) establecida en la resolución, siguiendo la relación  $DQO = 2.99 \cdot COT + 7.25$  (Dubber & Gray, 2010).

Estas limitaciones impiden que la fase acuosa pueda ser tratada de forma tradicional y obligan a buscar nuevas formas de tratamiento. El proceso hidrotermal de oxidación húmeda, en condiciones cercanas al punto crítico del agua, se presenta entonces como una alternativa novedosa para el tratamiento de este tipo de agua, con el fin de recircularla a los reactores de cultivo de microalgas. La oxidación húmeda (o WO, por sus siglas en inglés *Wet Oxidation*) de manera homóloga a la LHT, consiste en calentar agua cerca de

su punto crítico en presencia de un agente oxidante (oxígeno o peróxido de hidrógeno), con el fin de transformar la materia orgánica en compuestos orgánicos más simples que posteriormente son oxidados y convertidos en agua y dióxido de carbono (Hii et al., 2014; Kolaczowski et al., 1999).

Resumiendo, la producción de biocrudo a partir de microalgas vía licuefacción hidrotermal es un proceso que ha sido ampliamente estudiado; se ha evaluado el impacto del tipo de biomasa empleada sobre la calidad del crudo, así como, el efecto de las condiciones de reacción sobre la productividad de este biocombustible. Sin embargo, pocos estudios han tratado de integrar el tratamiento de la fase acuosa generada en el proceso, aún cuando los análisis químicos de esta agua demuestran el potencial de reutilización que tal residuo acuoso posee. El presente trabajo parte de la suposición de que es posible emplear la oxidación hidrotermal con peróxido como alternativa de tratamiento de la fase acuosa resultante de la licuefacción hidrotermal. A partir de esto, se hipotetiza que a través de las condiciones operativas del tratamiento es posible mejorar la calidad final del efluente y por ende, maximizar la cantidad de nutrientes y agua que pueden ser recirculados a los cultivos de algas. Finalmente, se podría mejorar la sostenibilidad ambiental y económica del ciclo productivo de biocrudo a partir de algas.

El objetivo general es evaluar la oxidación hidrotermal con peróxido como alternativa de tratamiento de la fase acuosa proveniente de la licuefacción hidrotermal de la microalga *Chlorella vulgaris*. Para lograr este objetivo general, los siguientes objetivos fueron alcanzados:

**1. Establecer las condiciones de tiempo de residencia y relación molar de peróxido que maximizan la proporción de agua que puede ser recirculada al cultivo de la microalga.**

El efecto de las condiciones de reacción de la oxidación hidrotermal con peróxido sobre la calidad del agua fue evaluado a partir de un diseño experimental aplicado a la fase acuosa obtenida de la LHT de la microalga *C. vulgaris* UTEX 2714 (Capítulo 2). El diseño experimental permitió obtener superficies de respuesta) en las que se evaluó el efecto del tiempo de residencia y la relación molar de peróxido sobre la concentración de los componentes mayoritarios de la fase acuosa (carbono orgánico total, amonio, nitrato,

fosfato, fenoles). Al final, la optimización de las superficies de respuesta permitió establecer las condiciones de reacción a las cuales se maximizaba la concentración de nutrientes en la fase acuosa mientras se minimizaba la presencia de fenoles (Capítulo 3).

## **2. Establecer el efecto de la dilución del agua resultante del proceso de oxidación hidrotermal con peróxido sobre el crecimiento de un cultivo de *Chlorella vulgaris*.**

El tratamiento hidrotermal con peróxido a las condiciones de reacciones óptimas no permite obtener una fase acuosa completamente libre de compuestos que resulten tóxicos para las microalgas, por lo que la efectividad del tratamiento se evaluó en función al crecimiento de nueva biomasa algal. Para ello, se planteó un diseño experimental que permitió comparar cultivos de la microalga *C. vulgaris* en medio de cultivo estándar suplementado con diferentes fracciones de las fases acuosa tratada y sin tratar. El análisis comparativo de crecimiento permitió establecer que factor de dilución mejoraba la productividad de biomasa, en comparación al cultivo control. Finalmente, la integración de los resultados obtenidos para el tratamiento hidrotermal con peróxido y para la recirculación de la fase acuosa, permitieron desarrollar un análisis energético simple en el que se contempló el ciclo productivo de biocrudo a partir de algas.

# **1. Residuos acuosos de procesos hidrotermales de producción de biocombustibles a partir de microalgas**

## **1.1 Introducción**

Además de haber motivado el desarrollo tecnológico y la optimización de métodos de producción industrial existentes, la creciente demanda energética a nivel mundial ha incentivado la búsqueda y valorización de fuentes de energía diferentes a los combustibles fósiles. Por una parte, la combustión de estos últimos constituye la principal fuente de contaminación atmosférica. Según datos de la Agencia Internacional de la Energía (IEA), la quema de carbón, gas natural y derivados del petróleo aporta más del 85% del material particulado en el aire, así como de las emisiones de dióxido de azufre y óxido de nitrógeno a la atmósfera (IEA & OECD, 2016). Por otro lado, el uso intensivo e insostenible de combustibles fósiles ha puesto en peligro de agotamiento las reservas existentes debido a su carácter no renovable. Por estos motivos, un gran esfuerzo se ha realizado para diversificar la oferta de combustibles, particularmente con aquellos de carácter renovable, lo que resultó en la creación de los biocombustibles.

Son diversos los combustibles que se han obtenido de biomasa e igualmente son muchos los retos que estos enfrentan para posicionarse como una alternativa económicamente

viable. Mientras que la primera generación de biocombustibles compite con la producción de alimentos y la segunda resulta el altos costos de tratamiento, la tercera, basada en microalgas, se presenta como una alternativa potencial ante los problemas ambientales y energéticos actuales (R. A. Lee & Lavoie, 2012). Las microalgas son organismos microscópicos diversos que no afectan la cadena de suministro de alimentos y además proveen gran energía a bajo costo. Ellas son capaces de remediar aguas residuales y además, los biocombustibles obtenidos a partir de ellas son amigables con el medio ambiente (V. Kumar et al., 2018; L. Wang et al., 2010; Yong et al., 2019). Estos microorganismos son de gran interés debido a la gran productividad de lípidos que pueden generar, pues puede llegar a ser entre 7 y 31 veces más grande que la productividad de aceite de palma (Al Hattab & Ghaly, 2015). A pesar de las ventajas que las microalgas presentan respecto a otras biomásas, su limitación está en la dificultad de escalar los sistemas de producción, y el contenido de agua que estas poseen (R. A. Lee & Lavoie, 2012).

Dada la variedad de especies de microalgas, son diversos los métodos y combustibles que se pueden obtener de ellas. Sin embargo, lo estudios energéticos se han centrado, principalmente, en la producción de biodiesel a partir de los lípidos que estas contienen así como en la conversión total de la biomasa algal en biocombustibles a través de procesos termoquímicos avanzados (López Barreiro et al., 2013a). Dentro de estos procesos, la licuefacción hidrotermal es el más establecido, dada la inexistencia de una etapa previa de secado. Sin embargo, como toda actividad que requiera agua para ser llevada a cabo, la generación de un agua residual es el principal desafío que esta tecnología debe afrontar para ser económica y ambientalmente viable.

Los residuos acuosos generados a partir de los procesos hidrotermales para producir combustibles a partir de microalgas son un tema de estudio actual dado que, (1) los procesos tradicionales de tratamiento de aguas residuales no son efectivos para tratar estos efluentes, (2) la descarga de fase acuosa sin tratar resulta tóxica para diversas especies acuáticas y, (3) la presencia de altas concentraciones de nutrientes puede ocasionar problemas medioambientales como la eutrofización de cuerpos de agua. Al final, la estrategia de tratamiento de estas aguas residuales se debe establecer a partir del análisis de las características físicas y químicas de este tipo de efluente.

## 1.2 Biocombustibles a partir de microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares capaces de realizar fotosíntesis, que se encuentran en todo tipo de ecosistema que hay sobre la tierra. Se ha estimado que existen más de 200.000 especies, de las cuales solamente un cuarto han sido estudiadas (Richmond, 2004). Según la especie, su tamaño puede variar entre 1 y 500  $\mu\text{m}$ , y pueden ser encontrados en forma libre o en colonia. Aunque la mayoría de microalgas se reproduce por mitosis, empleando fotosíntesis para convertir energía solar en energía química, su capacidad de adaptación para vivir en diferentes ambientes permite cultivarlas de al menos cuatro formas distintas dependiendo de la fuente energía y carbono que estas requieran (Tabla 1-1) (C. Y. Chen et al., 2011).

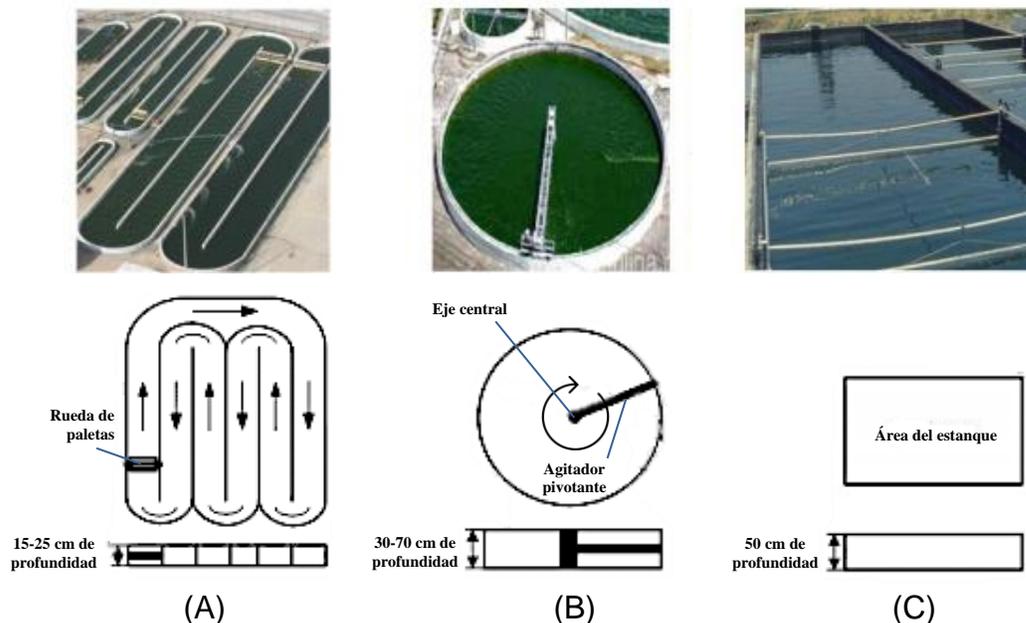
**Tabla 1-1. Características de diferentes métodos de cultivo de microalgas**

Tipo de cultivo	Fuente de energía	Fuente de carbono	Ejemplos
<b>Fotoautótrofo</b>	Luz	Compuestos inorgánicos (e.g. $\text{CO}_2$ )	<i>Nannochloropsis sp.</i> <i>Chlorella minutissima</i>
<b>Fotoheterótrofo</b>	Luz	Compuestos orgánicos (e.g. Glucosa)	<i>Chlorella emersonii</i> <i>Botryococcus braunii</i>
<b>Mixotrófico</b>	Luz	Compuestos orgánicos y/o inorgánicos	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Scenedesmus obliquus</i>
<b>Heterotrófo</b>	Compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos	<i>Chlorella protothecoides</i>

Por otra parte, el cultivo de microalgas se lleva a cabo en espacios que proporcionan condiciones de cultivo estables para el desarrollo de los microorganismos (temperatura, pH, concentración de  $\text{O}_2$ , concentración de nutrientes, intensidad de luz, entre otros). En este sentido, existen dos formas de cultivar las microalgas, dependiendo de si el dispositivo donde se cultivan es abierto (tipo estanque) o cerrado (fotobiorreactores) (Andersen, 2005).

Los sistemas abiertos están compuestos típicamente por un bucle cerrado o por canales de recirculación que permiten un mezclado a medida que el líquido circula (Figura 1-1). La instalación de este tipo de sistemas de cultivo resulta económica en comparación al costo del sistema de mezclado de los estanques (Richmond, 2004). Sin embargo, estos sistemas solo pueden ser empleados con microalgas capaces de crecer en condiciones particularmente extremas (de pH o salinidad) debido a que, al ser abiertos, son sensibles

a contaminación por otros tipos de organismos y las alteraciones que estos puedan generar. Adicionalmente los rendimientos obtenidos en este tipo de cultivos es bajo comparado con los sistemas cerrados, debido a que las fluctuaciones ambientales (temperatura, incidencia de luz solar, lluvias, sequías) inciden directamente en la eficacia del proceso (Terry & Raymond, 1985).



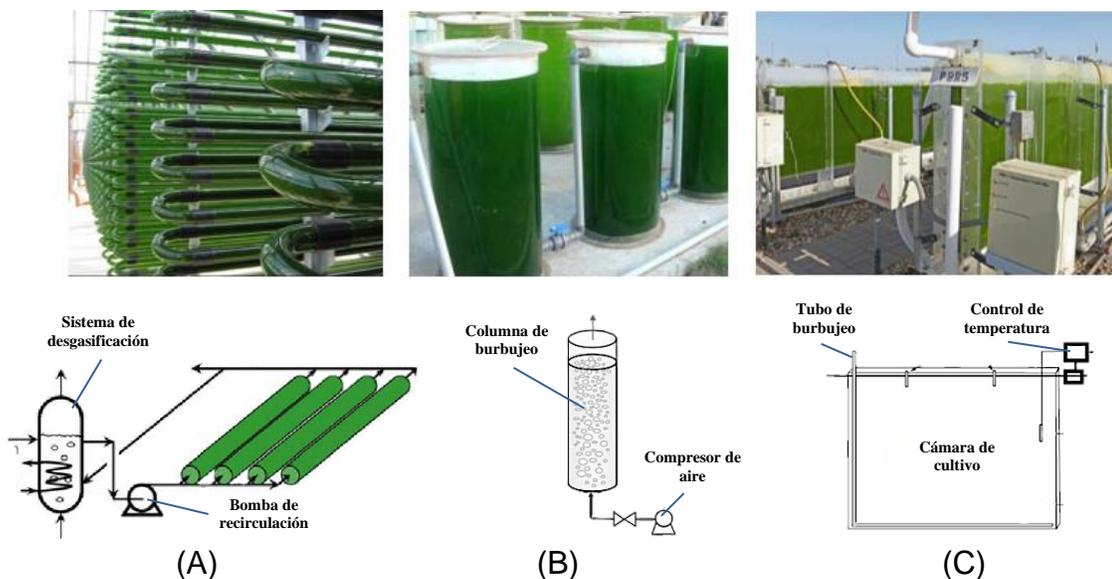
**Figura 1-1. Sistemas abiertos para el cultivo de microalgas.**

(A) Estanque canalizado, (B) Estanque circular agitado, (C) Estanque sin agitación.

Adaptado de Shen et al. (2009)

Por otro lado, los fotobiorreactores (PBR por sus siglas en inglés, *Photobioreactor*) fueron concebidos con el fin de contrarrestar los problemas de los sistemas abiertos. Al ser sistemas cerrados se tiene un mejor control sobre las condiciones de cultivo, lo cual permite obtener compuestos de mayor valor agregado; igualmente, al estar aislados del ambiente, microalgas más sensibles pueden ser cultivados en ellos, debido a que el riesgo de contaminación es mínimo (Richmond, 2004). Los PBR han sido concebidos de muchas formas, de columna, tubulares o de placas; dependiendo del objetivo que se pretenda con las microalgas (Figura 1-2). Sin embargo, a pesar de los beneficios de los sistemas cerrados respecto a los abiertos, el costo de diseño, construcción y operación de los PBR es mayor (C. Y. Chen et al., 2011; Y. Zhu et al., 2013).

Los diferentes sistemas de cultivo que se han desarrollado para la obtención de biomasa algal con fines energéticos derivaron de los crecientes problemas de suministro y contaminación causados por el uso de fuentes de energía fósil. Estos problemas estimularon la búsqueda de soluciones alternativas, como los biocombustibles de fuentes agroalimentarias. Sin embargo, a su vez, estos han causado otros problemas al mismo tiempo que satisfacen solo una fracción de la demanda masiva de combustibles en el mundo. La conversión gradual de fuentes de energía fósil a fuentes más naturales como la biomasa de algas es una vía razonable dados los desafíos globales de alimentación y tratamiento de residuos.



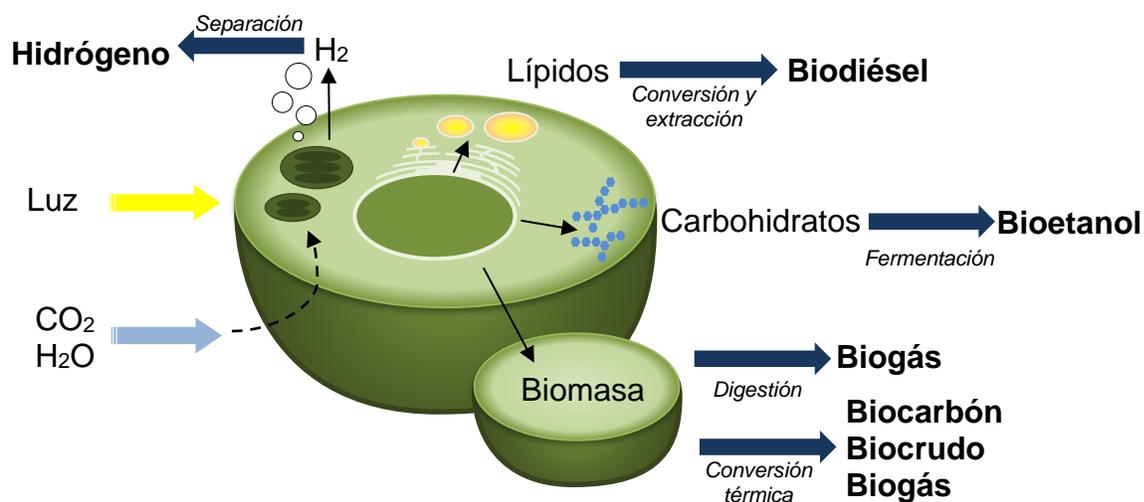
**Figura 1-2. Sistemas cerrados para el cultivo de microalgas.**

(A) Fotobiorreactor tubular, (B) Fotobiorreactor de columna, (C) fotobiorreactor de placas.

*Adaptado de Shen et al. (2009)*

En general, el concepto de biocombustibles basados en algas se basa en la reproducción acelerada de microalgas en el mar, dada por el proceso de fotosíntesis. Las tecnologías que explotan este concepto no requieren de agua de riego, grandes cantidades de agua potable, pesticidas ni grandes extensiones de tierra cultivable. Además, estas tecnologías se pueden aplicar al tratamiento de aguas residuales y la captura de CO<sub>2</sub> generado en procesos de combustión de diferentes industrias. La aplicación industrial de este concepto mitigaría la deforestación, el cambio de los modos de uso de suelos y las consiguientes amenazas a la biodiversidad, ya que puede aplicarse en tierras desérticas o sin cultivar.

En los últimos años, la producción de biocombustibles (biodiesel y bioetanol) de primera generación ha llevado a un aumento sustancial del precio de los alimentos en todo el mundo. Por ejemplo, desde 2008, se estimó que el precio de cereales y granos, como el maíz y la soja, incrementaría un 2.1% anual, según datos del Fondo Monetario Internacional (Baier et al., 2009). La explotación de microalgas puede representar un gran potencial para el desarrollo económico, ya que permitiría el surgimiento de industrias sostenibles, ayudando a la autosuficiencia energética, particularmente en países ubicados en zonas tropicales. Este enfoque también preservaría el patrimonio forestal y agrario de muchas partes del mundo, al limitar la deforestación y el agotamiento de los suelos sobreexplotados. El establecimiento de intercambios de carbono podría permitir intercambiar de manera rentable créditos de carbono generados por procesos basados en algas.



**Figura 1-3. Representación de los biocombustibles que se pueden obtener a partir de microalgas.**

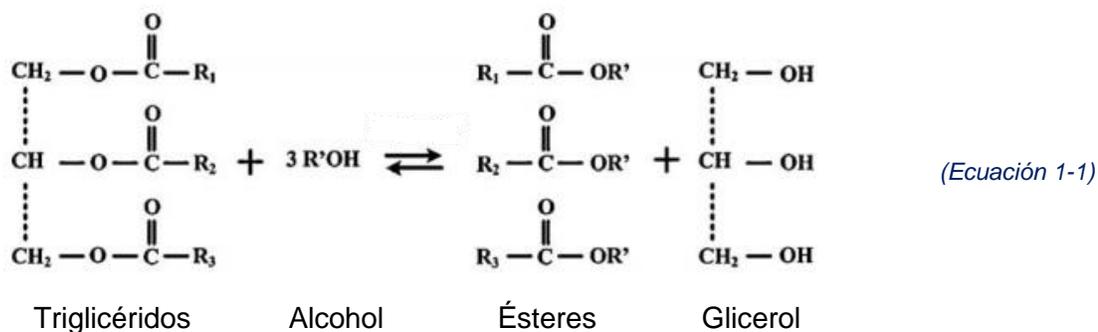
Adaptado de Posten & Schaub (2009)

A pesar de que el biodiesel es el biocombustible más explorado a partir de microalgas, son diversos los combustibles, o precursores de ellos, que se pueden obtener de esta biomasa (Figura 1-3). El biodiesel algal valoriza únicamente la fracción lipídica de la biomasa, sin embargo, el concepto de biorrefinería algal intenta dar valor agregado a cada uno de los componentes de las microalgas. En ese sentido, es posible obtener etanol por medio de la fermentación de azúcares sencillos y carbohidratos hidrolizados del alga, así como obtener hidrógeno mediante la optimización de las rutas metabólicas que ocurren en el cloroplasto.

Finalmente, la biomasa residual generada en los procesos anteriores puede ser tratada mediante procesos de térmicos o de digestión para producir gases y aceites precursores combustibles que pueden ser refinados.

### 1.3 Métodos de obtención de biocombustibles

Existen diferentes métodos de obtención de biocombustibles a partir de microalgas. Los más empleados son métodos extractivos, en los que los lípidos (triglicéridos) presentes en los microorganismos son extraídos de estos para hacerlos reaccionar con algún alcohol y obtener ésteres de alto poder calorífico (El-Shimi et al., 2013). Este proceso, denominado transesterificación, se compone de tres pasos reactivos, donde los triglicéridos son convertidos en diglicéridos, los diglicéridos convertidos en monoglicéridos y finalmente los monoglicéridos convertidos en ésteres, los cuales denominamos biodiesel, y glicerol como coproducto (Mata et al., 2010). La reacción global de este proceso se presenta en la (Ecuación 1-1).



Sin embargo, la producción de biodiésel a partir de microalgas es un proceso poco rentable, debido a que, por una parte, solo una pequeña porción de la biomasa es empleada para la obtención del biocombustible (los lípidos). Por otra parte, el agua presente en las microalgas es capaz de hidrolizar el biodiesel producido, disminuyendo los rendimientos de reacción (El-Shimi et al., 2013).

Dependiendo de la especie de microalga que se emplee y de las condiciones de cultivo, se puede obtener más o menos contenido de lípidos y por ende una mayor o menor

cantidad de biodiesel. No obstante, además de los problemas presentados anteriormente, la competitividad del proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas es baja con respecto al proceso tradicional de transesterificación de aceite extraído de plantas oleaginosas (El-Shimi et al., 2013; Hosseini et al., 2013; Y. Zhu et al., 2013).

Por estos motivos, procesos alternativos que permitan aprovechar más componentes de las microalgas y que sean rentables han sido estudiados. Es así, como los procesos termoquímicos se presentan como una alternativa que permite producir combustibles de mayor atractivo energético y económico, con mejores rendimientos productivos (Brennan & Owende, 2010; López Barreiro et al., 2013b; Suali & Sarbatly, 2012). Dependiendo del contenido de agua de la biomasa que se trata, los procesos termoquímicos se clasifican en secos y húmedos, los cuales a su vez se subdividen en función del subproducto principal (Tabla 1-2).

**Tabla 1-2. Procesos termoquímicos de conversión de microalgas en biocombustibles**

		Tipo de materia prima	
		Húmeda	Seca
<b>Producto principal y de interés</b>	Sólido	Carbonización hidrotermal (CHT)	Torrefacción
	Líquido	Licuefacción hidrotermal (LHT)	Pirólisis
	Gaseoso	Gasificación hidrotermal (GHT)	Gasificación

La torrefacción es el primero de los procesos térmicos secos, el cual permite obtener un producto carbonáceo a presión atmosférica y temperaturas entre 200 y 300°C en ausencia de oxígeno (W. H. Chen, Peng, et al., 2015). El alto costo energético asociado al secado de la biomasa junto con el bajo valor agregado del producto generado, hacen de este proceso poco útil para tratar biomasa algal; sin embargo, estudios sobre el tratamiento de residuos de alga secos han sido realizados (W. H. Chen, Huang, et al., 2015).

Si se aplican condiciones más severas a la biomasa seca (temperaturas entre 400 y 600°C) en ausencia de oxígeno, la pirólisis de la biomasa genera como productos biocrudo, carbón y gases. Diversos autores han estudiado este proceso de producción de biocrudo a condiciones de calentamiento rápido y lento (Jena & Das, 2011; Miao et al., 2004; Peng et

al., 2001). Pese a que el producto de la pirólisis es de mayor interés que el de la torrefacción, el biocrudo generado es poco estable (Chiaramonti et al., 2007) y no compensa el gasto energético del proceso y del secado de la microalga, lo que impide un desarrollo completo de este tipo de tecnología para microalgas (López Barreiro et al., 2013b).

Finalmente la gasificación de biomasa húmeda ocurre a temperaturas superiores de 700°C, donde la biomasa se oxida parcialmente para producir gas de síntesis (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>) (Cao et al., 2006). Durante el proceso, cuando la temperatura alcanza los 300°C la biomasa se seca, para enseguida empezar a oxidarse. En la mayoría de los casos el coste energético del proceso no es soportado por el contenido energético del gas de síntesis, debido a que durante el desarrollo de la gasificación alrededor del 23% del calor se pierde (Demirbaş, 2001). Sumado a esto, materias primas con humedades superiores al 20% hacen poco eficiente la gasificación (Brennan & Owende, 2010; López Barreiro et al., 2013b).

**Tabla 1-3. Procesos térmicos húmedos de conversión de microalgas en biocombustibles.**

*Adaptado de López Barreiro et al. (2013b) y Tian et al. (2014).*

	Carbonización hidrotermal	Licuefacción hidrotermal	Gasificación hidrotermal
<b>Temperatura</b>	100°C – 200°C	200°C – 400°C	> 400°C
<b>Presión</b>	< 5 MPa	5 – 20 MPa	> 20 MPa
<b>Producto principal</b>	Carbón vegetal	Biocrudo	CO, H <sub>2</sub> y/o CH <sub>4</sub>

Por otra parte, los procesos húmedos son ventajosos debido a que eliminan la necesidad de secar la biomasa; lo que es importante cuando la biomasa de algas puede alcanzar humedades de incluso el 95% del peso total de la microalga (Andersen, 2005; Melgarejo, 2010). Los procesos hidrotermales húmedos (carbonización hidrotermal, licuefacción hidrotermal y gasificación hidrotermal) requieren de agua, ya que a las condiciones de reacción, las propiedades del agua cambian y generan que esta se vuelva un reactivo más dentro del proceso, capaz de catalizar las reacciones que se llevan a cabo (Brennan & Owende, 2010; T. M. Brown et al., 2010; López Barreiro et al., 2013b; Suali & Sarbatly, 2012). En la Tabla 1-3 se resumen las principales características de estos procesos.

## 1.4 Licuefacción hidrotermal

La licuefacción hidrotermal, LHT, es un proceso de transformación química en presencia de agua, en el que la biomasa es sometida a altas condiciones de presión y temperatura para ser convertida en un biocombustible líquido, denominado biocrudo. (Demirbaş, 2001). Este proceso se lleva a cabo a condiciones cercanas al punto crítico del agua, lo que facilita la acción del agua como solvente, para extraer compuestos de la biomasa, y como reactivo, al propiciar reacciones de hidrólisis (Peterson et al., 2008; Toor et al., 2011).

En comparación con la producción de biodiesel y las rutas secas de transformación termoquímica de biomasa, la LHT presenta las siguientes ventajas:

- Elimina el proceso de secado, dado que la concentración de sólidos totales iniciales de la materia prima está entre un 10 y 30% p/p (90 – 70 % de agua). Al ser la licuefacción un proceso hidrotermal, los requerimientos de agua para llevar a cabo la reacción son aportados por el lodo húmedo de microalga que se emplea.
- Se reduce la resistencia a la transferencia de masa a condiciones cercanas al punto crítico (coeficiente de auto-difusión  $\approx 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s), con respecto al agua a 25°C y 1 atm (coeficiente de auto-difusión  $\approx 10^{-3}$  cm<sup>2</sup>/s) (Savage, 1999).
- Tanto los lípidos como los otros componentes de la biomasa (proteínas y carbohidratos) son susceptibles de ser convertidos en biocrudo. Por ejemplo, en la LHT de *Chlorella pyrenoidosa* con 0,1% en lípidos, se obtuvo un rendimiento de biocrudo del 39% a 280°C y 30 min (Guo Yu et al., 2014), así mismo para *Nannochloropsis sp.* (14% en lípidos) se obtuvo un rendimiento de biocrudo del 55% a 260°C y 60 min (H. Li et al., 2014); no obstante, la calidad del biocrudo en términos de su contenido de nitrógeno, mejora al incrementar el contenido de lípidos en las microalgas (H. Li et al., 2014).
- Su principal producto es el biocrudo, aunque también se obtienen gases ligeros (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> y C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), una fase acuosa (ácidos orgánicos, aminoácidos, entre otros) y sólidos residuales insolubles (ceniza y carbón) (López Barreiro et al., 2013b; Tian et al., 2014).

Además del biocrudo, como resultado de la reacción se obtiene una fase gaseosa (compuesta por CO<sub>2</sub> principalmente), unos residuos sólidos (conformados por cenizas y material que no reaccionó) y una fase acuosa. Como todo proceso de conversión termoquímica, los rendimientos de formación de cada fase se ven fuertemente influenciados por los parámetros operacionales (temperatura, tiempo de residencia, catalizador, relación biomasa/agua, etc.) (Jena, Das, et al., 2011).

Varios autores han estudiado la influencia de las principales condiciones de operación en el rendimiento del biocrudo, entre las cuales destacan la concentración de sólidos totales iniciales (5 – 30%) (Anastasakis & Ross, 2011; Jena, Das, et al., 2011), la temperatura de reacción (200 - 400°C) (Jena, Das, et al., 2011; Zou et al., 2009) el tiempo de residencia (5 - 120 min) (Christensen et al., 2014; Eboibi et al., 2014; H. Li et al., 2014) y el uso de catalizadores homogéneos (Christensen et al., 2014; Zou et al., 2009) o heterogéneos (P. Biller & Ross, 2011; Savage et al., 2011; Y. Xu et al., 2014). En forma similar, existe un número de autores que se han enfocado en mejorar la calidad del biocrudo, disminuyendo su contenido de oxígeno y nitrógeno, por medio de un postratamiento (desoxigenación y/o desnitrificación) (H. Li et al., 2014).

La fracción acuosa (FA), al igual que el biocrudo, es una de las fracciones más representativas de la licuefacción hidrotermal de microalgas. Su rendimiento aproximado se encuentra entre un 30 y 60 % en peso de la biomasa, con un alto contenido de material orgánico (P. Biller & Ross, 2011; Patel & Hellgardt, 2015). Los productos acuosos generalmente están compuestos por NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, iones metálicos (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, etc.), ácidos orgánicos (acético, fórmico, glicólico), fenoles, aminoácidos y glicerol (García et al., 2013; López Barreiro, Bauer, et al., 2015).

Diversos autores han evaluado la posibilidad de recircular esta fase acuosa al cultivo de microalgas debido a que algunas de las sustancias presentes en esta, como el amonio y los fosfatos, son nutrientes que las microalgas pueden consumir para su desarrollo. Sin embargo, los resultados demuestran que grandes diluciones de esta fase (1 mL de fase acuosa / 500 mL de medio de cultivo) son necesarias para que las microalgas crezcan (P. Biller et al., 2012; García et al., 2013; López Barreiro, Bauer, et al., 2015; Tian et al., 2014).

Esto se debe a que la concentración de algunos compuestos tóxicos, como los fenoles, inhiben el crecimiento de la microalgas.

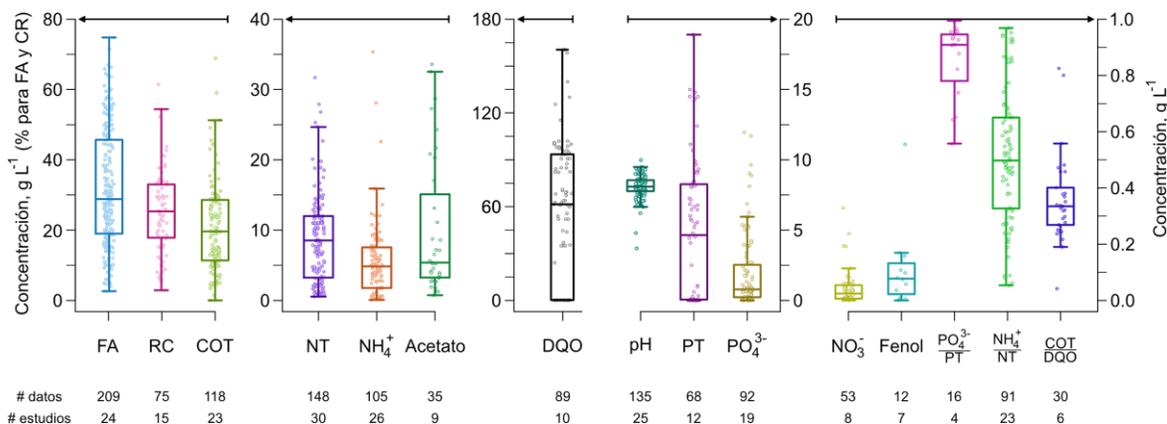
El problema en este punto es que, al realizar diluciones tan grandes, la mayoría de la fase acuosa no es reutilizada y al diluir los fenoles, también se diluyen los nutrientes, por lo que es necesario reponer parte de estos en los cultivos (P. Biller et al., 2012; Garcia et al., 2013). Considerando lo anterior, es importante conocer de antemano la composición de la fase acuosa ya que, esto permite establecer un punto de partida para el tratamiento de esta. La mejora de la calidad de la fase acuosa permitiría su descarte como efluente final de la LHT o su valorización y mejor integración como subproducto del proceso.

## **1.5 Residuo acuoso de la licuefacción hidrotermal**

Como se mencionó anteriormente, la fase acuosa es el principal subproducto de la LHT, debido al alto contenido de humedad de la biomasa (> 80%) empleada para la reacción. Este efluente acuoso es una mezcla compleja de sustancias químicas, resultantes de la reacción, compuestas principalmente por carbono orgánico y nitrógeno, además de componentes tóxicos como metales pesados y compuestos cíclicos oxigenados y nitrogenados. Las propiedades fisicoquímicas del agua obtenida varían en función de las condiciones de reacción de la licuefacción. En la Figura 1-4 se resumen las principales propiedades fisicoquímicas de la fase acuosa de la LHT que han sido estudiadas por diversos autores.

Los datos graficados son el resultado de una extensa revisión bibliográfica en la que, se consideraron diferentes publicaciones sobre licuefacción hidrotermal de microalgas (84 publicaciones). No todas las publicaciones encontradas fueron tenidas en cuenta para el análisis, debido a que no presentaban información dentro de los filtros de información establecidos. En primer lugar, se filtraron aquellas publicaciones que revisaban y recopilaban información de otros autores (11 artículos); así como aquellas publicaciones que no presentaban información sobre la fase acuosa o cuya información provenía de estudios previos, igualmente considerados en este análisis (13 artículos). Finalmente, se removieron aquellos artículos en los que la temperatura de reacción de la LHT se

encontraba fuera del rango 250 - 450 °C (10 artículos). Al final, de 50 artículos restantes, se extrajeron los resultados reportados para cada condición experimental estudiada por los autores. En total, 247 grupos de datos fueron obtenidos y analizados.



**Figura 1-4. Propiedades de la fase acuosa derivada de la licuefacción hidrotermal de microalgas.**

Datos recopilados de 50 estudios para diferentes condiciones de reacción (Temperatura: 250 – 450°C, tiempo de residencia: 0 – 120 minutos, carga inicial de sólidos: 1 – 35% p/p) y composición de biomasa variable (Proteína: 0.1 – 71 % peso seco, lípidos: 0.1 – 71.3 % peso seco). (Aida et al., 2016; Anastasakis & Ross, 2011; Bagnoud-Velásquez et al., 2015; P. Biller & Ross, 2011; P Biller et al., 2012; Patrick Biller et al., 2016; Cherad et al., 2016b; Christensen et al., 2014; Costanzo et al., 2015; Duan et al., 2018; Edmundson et al., 2017; Ekpo et al., 2016; Elliott et al., 2013; Erkelens et al., 2015a; Faeth et al., 2016; Fushimi et al., 2016; Gai et al., 2014; Garcia et al., 2013; He et al., 2018; Hognon et al., 2014; Jena, Das, et al., 2011; H. Li et al., 2014; López Barreiro, Bauer, et al., 2015; López Barreiro, Riede, et al., 2015; Maddi et al., 2016; Madsen et al., 2016; Neveux et al., 2014; Patel et al., 2016; Patel & Hellgardt, 2015; Phani et al., 2019; Selvaratman et al., 2015; Shakya, 2014; Shakya et al., 2017; Shanmugam, Adhikari, & Shakya, 2017; Shanmugam, Adhikari, Wang, et al., 2017; Talbot et al., 2016; Tantiphiphatthana et al., 2015; Tommaso et al., 2015; Valdez et al., 2011, 2012; Y. F. Yang et al., 2004; Guo Yu et al., 2011, 2014; L. Zhang, Lu, Zhang, Li, Liu, Duan, et al., 2016).

(FA) Rendimiento de fase acuosa, (RC) Recuperación de carbono en fase acuosa, (COT) Carbono orgánico total, (NT) Nitrógeno total, (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) Amonio total expresado como nitrógeno, (DQO) Demanda química de oxígeno, (PT) Fósforo total), (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) Fosfato total expresado como fósforo, (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) Nitratos totales expresados como nitrógeno. Las flechas indican el eje de las unidades para cada diagrama de cajas y bigotes. El valor de pH y las relaciones másicas no tienen unidades.

### 1.5.1 pH de la fase acuosa

En promedio, el pH de la fase acuosa resultante de la licuefacción hidrotermal de microalgas es de 7.98, con un rango de variación entre 3.70 a 9.98 (Figura 1-4). El valor de pH más bajo se obtuvo de la licuefacción de *Chlorella sp.* (Maddi et al., 2016) y el más alto se obtuvo para la FA resultante de la LHT de *Nannochloropsis sp.* (Patel et al., 2016). En general, se encuentra que el pH de la fase acuosa es fuertemente dependiente de la composición bioquímica de la biomasa. Microalgas con altos contenidos de proteína ocasionan valores de pH por encima de 8.0 debido a la alta tasa de formación de amonio a partir de la hidrólisis de proteínas. En cambio, biomاسas con una mayor proporción de lípidos que proteína, generan valores de pH cercanos a 5.0 (Maddi et al., 2016; L. Zhang, Lu, Zhang, Li, Liu, & Duan, 2016).

A pesar de que la composición de la biomasa incide en el pH final de la fase acuosa, la cantidad que se carga de esta al reactor no tiene un efecto significativo. Por otra parte, la temperatura de reacción tiene un efecto directamente proporcional sobre el pH de la fase acuosa. Un estudio sobre la LHT de *Nannochloropsis sp.* reportó que a 350°C y 60 min el pH de la FA era de 10.0; mientras que a 300°C el pH era de 7.0 (Patel et al., 2016). Resultados similares fueron encontrados por Yuet et al. (2011), quienes concluyeron que a mayores temperaturas, el pH decaía debido a la descarboxilación de los ácidos orgánicos formados durante la LHT.

### 1.5.2 Carbono

El carbono es el principal constituyente de la masa reactiva de la LHT, por lo que la cantidad de biomasa, así como su composición, afectan la distribución de este elemento en los productos resultantes de la licuefacción. Como se aprecia en la Figura 1-4, la recuperación de carbono en la fase acuosa se expresa como el porcentaje de carbono en esta, respecto al carbono alimentado en la biomasa. Esta recuperación varía entre 2.89 y 61.4%, con un promedio de 25.2%. El contenido de proteínas en la biomasa parece influir de manera positiva en el rendimiento de producción de fase acuosa así como en la recuperación de carbono a través de esta (Duan et al., 2018; Neveux et al., 2014). Por el

contrario, incrementos en la temperatura de reacción y en los sólidos cargados al reactor generan menores rendimientos con baja recuperación de carbono (Christensen et al., 2014; Maddi et al., 2016)(Tantiphiphathana et al., 2015).

Le demanda química de oxígeno, así como el carbono orgánico total contenido en la FA, muestran tendencias similares a las del rendimiento de fase acuosa. A partir de los estudios consultados, se tiene que la DQO varía entre 0.11 y 160 g·L<sup>-1</sup>, con un promedio de 55 g·L<sup>-1</sup>. El amplio rango de variación se debe a la variedad de temperaturas estudiadas para amplios rangos de carga de sólidos. En cuanto al COT, se tiene un valor promedio de 22.5 g·L<sup>-1</sup> variando entre 0.01 y 95 g·L<sup>-1</sup>. El valor más alto de COT fue obtenido cuando la microalga *C. vulgaris*, con un alto contenido de proteínas (60.6 % p/p) fue procesada a 350°C durante 60 minutos (Ekpo et al., 2016). Nuevamente, los autores concuerdan que mayores contenidos de proteína en la biomasa ocasionan una mayor concentración de COT así como una mayor DQO de la fase acuosa obtenida (Yalin Li et al., 2017; Madsen et al., 2016)

### 1.5.3 Nitrógeno

En proporción, el nitrógeno es el segundo elemento mayoritario que se encuentra en la fase acuosa resultante de la licuefacción hidrotermal de microalgas. Debido a que este elemento es parte constitutiva de las proteínas, su concentración en el efluente acuoso depende fuertemente del contenido proteico de la biomasa empleada (Yalin Li et al., 2017; Madsen et al., 2016). En general, más del 50% del nitrógeno alimentado a la reacción es recuperado en la fase acuosa, con concentraciones de nitrógeno total que varían entre 0.64 y 62 g N·L<sup>-1</sup> (Figura 1-4). El nitrógeno en la fase acuosa se encuentra como nitrógeno ligado a materia orgánica, nitrato y nitrito, pero mayoritariamente como amonio. En promedio, la proporción de amonio en la FA respecto al nitrógeno total es del 51%.

Al igual que con el COT, Ekpo et al. (2016) obtuvieron el mayor contenido de nitrógeno total en la fase acuosa (62 g N·L<sup>-1</sup>), a partir de la LHT de *C. vulgaris*. Cuando el contenido de proteínas en la biomasa fue menor que el de lípidos, la LHT de la microalga *Chlorella sp.* resultó en concentraciones de nitrógeno total y amonio más bajas, 2.11 y 0.50 g N·L<sup>-1</sup>,

respectivamente (Shakya et al., 2017). Por otra parte, las condiciones de reacción también afectan el contenido de nitrógeno de la fase acuosa. Por ejemplo, bajas concentraciones de sólidos resultan en bajas concentraciones de nitrógeno total (Gai et al., 2014; Teymouri et al., 2016), mientras que, tiempos de reacción prolongados y mayores temperatura de reacción generan un incremento del NT y del amonio contenido en la fase acuosa (Gai et al., 2014; Valdez et al., 2012)

### 1.5.4 Fósforo

La presencia de fósforo en la fase acuosa está ligado al contenido de cenizas en la biomasa ya que, estas últimas contienen metales que en bajas concentraciones favorecen la transferencia de fósforo hacia la fase acuosa (entre el 85 – 100% del P contenido en la biomasa) (Bagnoud-Velásquez et al., 2015). Si la concentración de metales, principalmente Ca, Mg y Fe, es alta, la transferencia es baja (< 30%), debido a que el fósforo reacciona y precipita, conformando parte de los productos sólidos de la reacción (Jena, Das, et al., 2011).

Como se observa en la Figura 1-4, la concentración promedio de fósforo total y fosfato en la fase acuosa es de, 4.84 y 1.98 g P·L<sup>-1</sup>, variando entre 0 – 19 y 0 – 12 g P·L<sup>-1</sup>, respectivamente. La diferencia entre las dos concentraciones promedio se debe a las condiciones de reacción empleadas por diferentes estudios, ya que se ha demostrado que, como resultado de la licuefacción, el fósforo se encuentra en más de un 90% como fosfato (Aida et al., 2016; Patel et al., 2016; Y. F. Yang et al., 2004).

La principal variable de reacción que afecta el contenido de fósforo en la fase acuosa es la carga inicial de sólidos. Se ha encontrado que reducir la concentración de sólidos de 35 a 15%, resulta en una reducción aproximada del 71% del fósforo total en la fase acuosa de la LHT de *Chlorella sp.* (Gai et al., 2014). Por otro lado, varios autores afirman que el uso de un solvente orgánico para recuperar el biocrudo de la fase acuosa, reduce el contenido de fosfatos en esta última debido a la extracción de organofosfatos y fosfolípidos junto con el biocrudo (Cherad et al., 2016c).

### 1.5.5 Otras características

Otros componentes mayoritarios en la fase acuosa son los ácidos orgánicos y los compuestos fenólicos. Los ácidos se originan a partir de la descomposición de los carbohidratos de la microalga, por lo que, la concentración de estos en la fase acuosa depende de la composición de la biomasa. El principal ácido que se produce, así como el más estudiado es el acético (P. Biller et al., 2012; Cherad et al., 2016c; Jena, Das, et al., 2011; Maddi et al., 2016). En promedio, la fase acuosa contiene  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de acetato. La concentración más baja reportada ( $0.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se obtuvo al licuar *Scenedesmus* a  $350^\circ\text{C}$  durante 15 minutos (López Barreiro, Riede, et al., 2015). Mientras que la más alta, se obtuvo al licuar macroalgas bajo las mismas condiciones reactivas ( $33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Duan et al., 2018).

Adicionalmente, la fase acuosa contiene una gran variedad compuestos fenólicos y cíclicos, que en su mayoría son considerados tóxicos para diferentes especies acuáticas. Fenoles, indoles, ciclo amidas y pirazinas se cuentan como los principales productos de la LHT (P Biller et al., 2012; Jena, Das, et al., 2011). Se cree que además de estas moléculas, hay muchas otros compuestos nitrogenados y oxigenados que aún no han sido identificados dentro de la matriz acuosa. La mayoría de los estudios se ha centrado en cuantificar la unidad más simple de estas moléculas, el fenol, dentro de los análisis de calidad de agua de esta fase acuosa. En promedio, la fase acuosa contiene hasta  $113 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$ , es decir, 10 veces la concentración que se ha encontrado que inhibe el crecimiento de la microalga *C. vulgaris* (Scragg, 2006).

La presencia de estos últimos compuestos es lo que hace imperativo el tratamiento de la fase acuosa. Por una parte, en el contexto colombiano, la normatividad no permite la descarga de este tipo de aguas residuales a cuerpos superficiales de agua (Resolución n 631-2015, 2015). Por otra, si se quisiera valorizar este efluente, por medio de la recuperación de nutrientes que contiene, incluso grandes diluciones no permiten el desarrollo normal de nueva biomasa algal (X. Chen et al., 2018).

## **2. Licuefacción hidrotermal de microalgas para la producción de biocrudo**

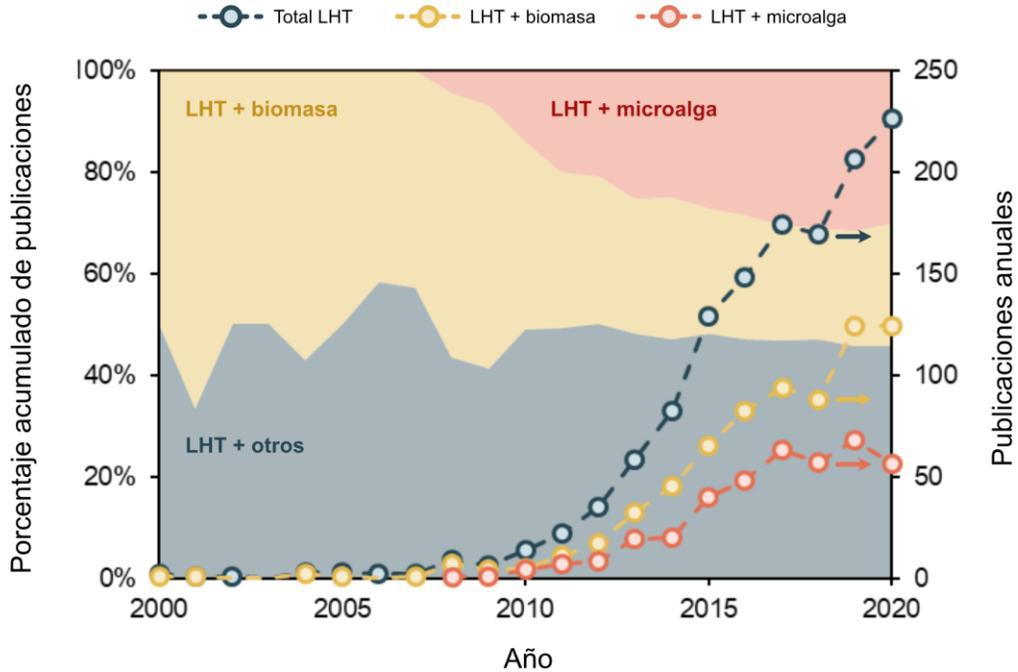
El presente capítulo presenta los métodos empleados para la producción de biocrudo a partir de microalgas, desde la producción de la biomasa hasta la reacción de licuefacción hidrotermal, haciendo particular énfasis en las características de la biomasa empleada y el balance de materia de la reacción. Igualmente, se presenta y analiza algunas características de la fase acuosa obtenida.

### **2.1 Introducción**

La definición por parte de las Naciones Unidas de los Objetivos del Milenio, ahora Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), incentivó el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías para la obtención de biocombustibles con el fin de garantizar el desarrollo sostenible del mundo, respetando los principios de protección del medio ambiente, desarrollo económico y equidad social (United Nations, 2000).

A juzgar por el número de publicaciones sobre licuefacción hidrotermal, las primeras publicaciones sobre este tipo de tecnología datan de finales del siglo XX. Sin embargo, no fue sino hasta mediados del año 2005 que este proceso comenzó a adquirir mayor interés, coincidiendo con el tiempo en que los Objetivos del Milenio, así como el protocolo de Kioto entraron en vigor (Figura 2-1). Desde sus orígenes, el uso de biomasa en procesos de

licuefacción hidrotermal ha sido una constante a lo largo de los años; a pesar de esto, solo hasta finales de la primera década del siglo XXI se empezó a ver a las microalgas como potencial fuente de biocombustibles.



**Figura 2-1. Registro histórico de publicaciones en Web of Science sobre licuefacción hidrotermal.**

Para el registro se tuvieron en cuenta aquellas publicaciones que contienen las palabras “hydrothermal liquefaction”, “hydrothermal liquefaction AND biomass” y “hydrothermal liquefaction AND microalgae”, tanto en inglés como en español. Las áreas de color en el fondo representan el porcentaje anual acumulado de publicaciones sobre licuefacción hidrotermal de biomasa y microalgas. El porcentaje restante de publicaciones corresponde a estudios de licuefacción hidrotermal no aplicados a biomasa o microalgas, los cuales se agrupan como “LHT + otros”. Los porcentajes se calculan respecto al total acumulado de publicaciones sobre licuefacción hidrotermal hasta cada respectivo año. Consultado el 05 de enero de 2021.

- **Licuefacción hidrotermal**

La licuefacción hidrotermal, LHT (o HTL por sus siglas en inglés *HydroThermal Liquefaction*), es un proceso térmico a alta presión en el que se busca que los constituyentes orgánicos de biomasa húmeda se conviertan principalmente en un combustible oleoso y líquido, denominado biocrudo, simulando el proceso natural de formación de petróleo (Demirbaş, 2001). Esta transformación se lleva a cabo a través de

reacciones complejas de polimerización, despolimerización y condensación; en las que el agua no solo actúa como solvente, sino también como reactivo al favorecer la hidrólisis de la materia orgánica (Demirbaş, 2001; S. Kumar, 2012)

La licuefacción hidrotermal se lleva a cabo en presencia de agua a condiciones subcríticas, cercanas a su punto crítico (374°C y 218 atm). A estas condiciones, el agua deja de ser una sustancia polar y se convierte en solvente apolar capaz de extraer y disolver compuestos orgánicos de la biomasa (Peterson et al., 2008; Toor et al., 2011). Adicional a esto, la constante de disociación del agua,  $K_w$ , se incrementa en 3 órdenes de magnitud, respecto al agua a condiciones ambientales, provocando un incremento en el número de iones  $H^+$  y  $OH^-$ , que pueden promover el desarrollo de reacciones ácido-base (S. Kumar, 2012; Savage, 1999).

Como todo proceso de conversión termoquímica, la LHT de biomasa conduce a una mezcla compleja de productos distribuidos en diferentes fases. El producto principal (biocrudo) se caracteriza por ser una fase oleosa compuesta de moléculas orgánicas, principalmente hidrocarburos lineales y ramificados  $C_{15}$ - $C_{33}$ , así como compuestos cíclicos nitrogenados y oxigenados. Como subproductos de la reacción se obtiene una fase acuosa (conformada mayoritariamente por compuestos inorgánicos solubles, ácidos, alcoholes y fenoles), una fase gaseosa (que contiene  $CO_2$  y en menor grado hidrocarburos gaseosos), y residuos sólidos (cenizas) (López Barreiro et al., 2013b).

La formación de una fracción u otra es fuertemente influenciada por las condiciones de reacción. La temperatura de reacción, el tiempo de residencia, la biomasa empleada y la concentración inicial de sólidos son las principales variables de proceso y son de suma importancia si se desea optimizar el rendimiento de producción de biocrudo (P. Biller & Ross, 2011; Garcia Alba et al., 2012; Jena, Das, et al., 2011).

- **Condiciones de reacción**

Son varios los autores que han estudiado el efecto de las variables de operación de la LHT sobre el rendimiento de biocrudo a partir de microalgas. Comenzando por la temperatura de reacción, se ha encontrado un rango de operación óptimo entre 280 y 350°C

(Anastasakis & Ross, 2011; Eboibi et al., 2014; Guo et al., 2015; Jena, Das, et al., 2011; López Barreiro et al., 2013a; López Barreiro, Riede, et al., 2015; Timmons & Losordo, 1994). Por debajo de este rango solo se favorecen reacciones de hidrólisis que resultan en la carbonización de la biomasa y, por ende, en una mayor producción de residuos sólidos. Por el contrario, cuando la temperatura supera el punto crítico del agua, más gases son producidos como resultado de la descarboxilación y gasificación (Guo et al., 2015).

De manera análoga a la temperatura, el tiempo de residencia de la reacción tiene un efecto sobre el rendimiento de biocrudo (Christensen et al., 2014; Eboibi et al., 2014; H. Li et al., 2014). Por un lado, tiempos de reacción cortos no son suficientes para que toda la biomasa pueda reaccionar, por lo que se obtiene una mayor fracción sólida. Por otra parte, tiempos demasiado largos favorecen la descomposición del biocrudo a fracciones acuosas y gaseosas más ligeras. Los rangos estudiados varían entre 5 y 120 minutos, pero en general tiempos mayores a 60 minutos no son recomendados para que el proceso sea económicamente viable (Faeth et al., 2013; Garcia Alba et al., 2012).

En cuanto a la concentración inicial de sólidos, no existe una tendencia clara en cuanto al efecto de estos sobre los rendimientos de producción de biocrudo. En general, la concentración de sólidos totales iniciales varía entre 5 y 30% (Anastasakis & Ross, 2011; Jena, Das, et al., 2011). Finalmente, también se ha evaluado el uso de catalizadores homogéneos (Christensen et al., 2014; Zou et al., 2009) y heterogéneos (P. Biller & Ross, 2011; Savage et al., 2011; Y. Xu et al., 2014) para incrementar los rendimientos de producción de biocrudo.

- **Fase acuosa**

La fracción acuosa, al igual que el biocrudo, es una de las fracciones más representativas de la licuefacción hidrotermal de microalgas y su rendimiento aproximado es entre el 30 y el 60 % en peso de la biomasa seca, con un alto contenido de material orgánico (P. Biller & Ross, 2011; Patel & Hellgardt, 2015). Los productos acuosos generalmente están compuestos por  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , iones metálicos ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , etc.), ácidos orgánicos (acético, fórmico, glicólico), fenoles, aminoácidos y glicerol (Garcia et al., 2013; López Barreiro, Bauer, et al., 2015). La composición de la fase acuosa resultante del proceso de LHT depende en gran medida de la composición de la biomasa cargada al

reactor, así como de las condiciones de reacción empleadas. Más detalles sobre la composición de la fase acuosa fueron presentados en el capítulo anterior.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Mantenimiento y producción de biomasa algal

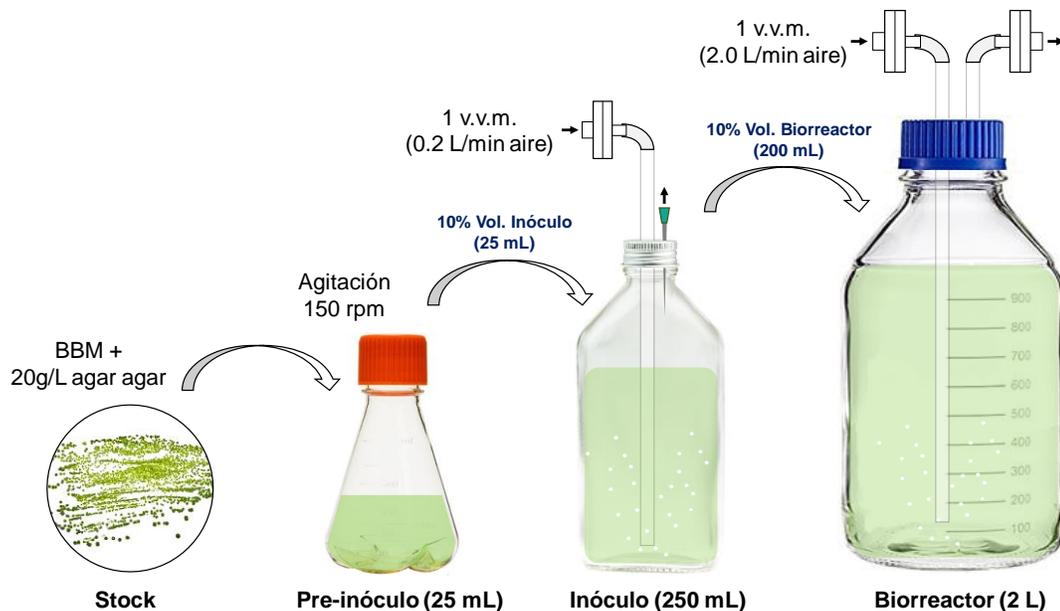
Se seleccionó la microalga *Chlorella vulgaris* por su disponibilidad, fácil mantenimiento, elevada velocidad de crecimiento y uso frecuente en reportes de licuefacción hidrotermal para producir biocrudo (Safi, Zebib, et al., 2014a; Q. H. Shen et al., 2015). La microalga fue adquirida de los laboratorios UTEX en Estados Unidos (ref. 2714) y se mantuvo de forma axénica en el cepario del Laboratorio de Ingeniería Bioquímica en cajas de Petri con medio de cultivo sólido BBM (*Bold Basal Medium*), a una temperatura de cultivo de  $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y una intensidad de luz de 3000 lux, empleando luces LED como fuente de iluminación artificial (color blanco frío, 120 LEDs  $\text{m}^{-1}$ , potencia 10 kW), programadas para estar encendidas 12 horas y apagadas 12 horas (fotoperiodo 12:12 LO). La cepa fue resembrada cada 3 meses.

La biomasa necesaria para llevar a cabo la licuefacción hidrotermal fue obtenida mediante un tren de inóculo, pasando de medio sólido hasta cultivos en medio líquido (Figura 2-2). Las colonias de microalga de las placas de Petri del cepario se aislaron mediante un asa microbiológica y se inocularon en 25 mL de medio BBM estéril, para ser cultivadas en una incubadora *Heidolph ProMax 1020*, en Erlenmeyer bafleados de 125 mL, con el fin de constituir el pre-inóculo de los ensayos. En este punto, el intercambio de gases se permitió a través de una membrana estéril, de tamaño de poro  $0.22 \mu\text{m}$ , acoplada a las tapas de los Erlenmeyer.

El pre-inóculo se mantuvo durante 10 días, hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo, para luego transferir 25 mL a botellas planas de vidrio (referencia L-3222 del catálogo de Unicor S.A., con capacidad de 375 mL, alto x ancho x profundo = 178.05 x 89.37 x 45.4 cm), con 225 mL de medio BBM estéril (10% del volumen total de cultivo), para establecer

el inóculo de los biorreactores de 2.0 L. A diferencia del pre-inóculo, a las botellas planas de vidrio se les inyectó aire atmosférico filtrado a  $0.22 \mu\text{m}$ , a una razón de 1 vvm (volumen de aire por volumen de líquido por minuto) y se mantuvieron en una incubadora diseñada y construida especialmente para el proyecto. Esta incubadora mantenía condiciones de cultivo controladas a  $25.0 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$ , intensidad de luz de 10.000 lux y fotoperíodo 12:12 LO.

Finalmente, durante la fase estacionaria del inóculo (10 días de cultivo), 200 mL del cultivo se tomaron para inocular los biorreactores de 2.0 L que contenían 1.8 L de medio BBM estéril (Botellas Schott® Duran de 2.0 L, de borosilicato 3.3, diámetro externo x altura = 136 x 265 mm). Análogamente al inóculo, los cultivos a esta escala se mantuvieron por 10 días con burbujeo de aire estéril a 1 vvm, en la misma incubadora bajo las mismas condiciones de cultivo.



**Figura 2-2. Esquema del tren de inóculo para el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.**

Los cultivos se realizaron empleando medio de cultivo BBM y las condiciones de cultivo se mantuvieron constantes durante cada etapa del cultivo (Temperatura de  $25,0^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$ , intensidad de luz de 3000 lux empleando luces LED blancas, fotoperíodo 12:12 Luz:Oscuridad, y agitación orbital de 150 rpm para pre-inóculo en Erlenmeyer)

Debido a que *Chlorella vulgaris* es una microalga pequeña (2 a  $10 \mu\text{m}$  de diámetro, según la literatura (Wiel et al., 2017) la manera más económica y eficiente de recolectar la

biomasa, sin adición de productos químicos, es la centrifugación. Cabe anotar que la cepa algal del presente trabajo tenía un diámetro promedio de  $5.3 \pm 3.7 \mu\text{m}$ , calculado a partir del análisis de más de 200 fotografías empleando ImageJ®. Después de cada cultivo, la microalga se transfirió a tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 2500 g por 5 minutos en un centrifuga *Heetich Rotifix 32*, para eliminar agua y obtener una pasta con una concentración aproximada de 20% en peso seco de microalga. La pasta se mezcló con agua destilada para eliminar sales remanentes del cultivo (a una relación volumétrica 1:3, pasta:agua) y se sometió nuevamente a centrifugación. El proceso se repitió 2 veces más.

La pasta de microalga concentrada se distribuyó en viales de vidrio y luego se congeló a  $-20.0^{\circ}\text{C}$ , para su posterior secado en un liofilizador *Labconco FreeZone 4.5* operado a 0.012 mbar durante 48 horas. La microalga liofilizada se almacenó en un frasco hermético de vidrio para ser analizada y llevar a cabo la reacción de licuefacción.

## 2.2.2 Caracterización de la biomasa

La biomasa obtenida fue analizada para establecer las condiciones de partida de la reacción de LHT y así poder establecer los rendimientos de esta.

### 2.2.2.1. Cenizas

Las cenizas totales presentes en la microalga liofilizada se determinaron empleando un método termogravimétrico. Para ello, se empleó una mufla capaz de calentar las muestras hasta  $575^{\circ}\text{C}$  por 4 horas, provocando la combustión de todo el material orgánico (Sluiter et al., 2008) (**Error! Reference source not found.**).

### 2.2.2.2. Humedad

Una balanza de humedad AMB 50, marca *Adam Equipment*, se empleó para determinar la humedad total en la microalga liofilizada, para así poder realizar las respectivas correcciones de peso seco de la misma (**Error! Reference source not found.**).

### 2.2.2.3. Disrupción celular y caracterización bioquímica

Con el fin de cuantificar el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de la microalga cosechada, se tomaron alícuotas de biomasa liofilizada y se resuspendieron en 100 mL de solvente (según corresponda para cada biomolécula) en un vaso de precipitados de 250 mL, para posterior disrupción celular por ultrasonido. Se empleó un sonicador *Branson Sonifier 450® Digital* acoplado a un cuerno de 1/2", cuya frecuencia sonicación es 20 kHz y un porcentaje de amplitud constante del 60%.

El vaso de disrupción se mantuvo por debajo de los 25°C, empleando un baño de agua con hielo, y se mezcló constantemente por agitación magnética. Para evitar el sobrecalentamiento del equipo, se mantuvieron ciclos de 60 segundos de ultrasonación y 20 segundos de pausa. El procedimiento se mantuvo por una hora y se tomaron muestras a lo largo del tiempo para obtener las curvas de disrupción.

La concentración de proteínas, lípidos y carbohidratos se cuantificó empleando los métodos de Bradford, sulfo-fosfo-vainillina y fenol-sulfúrico, respectivamente, según se detalla en el material suplementario (Anexos C-E).

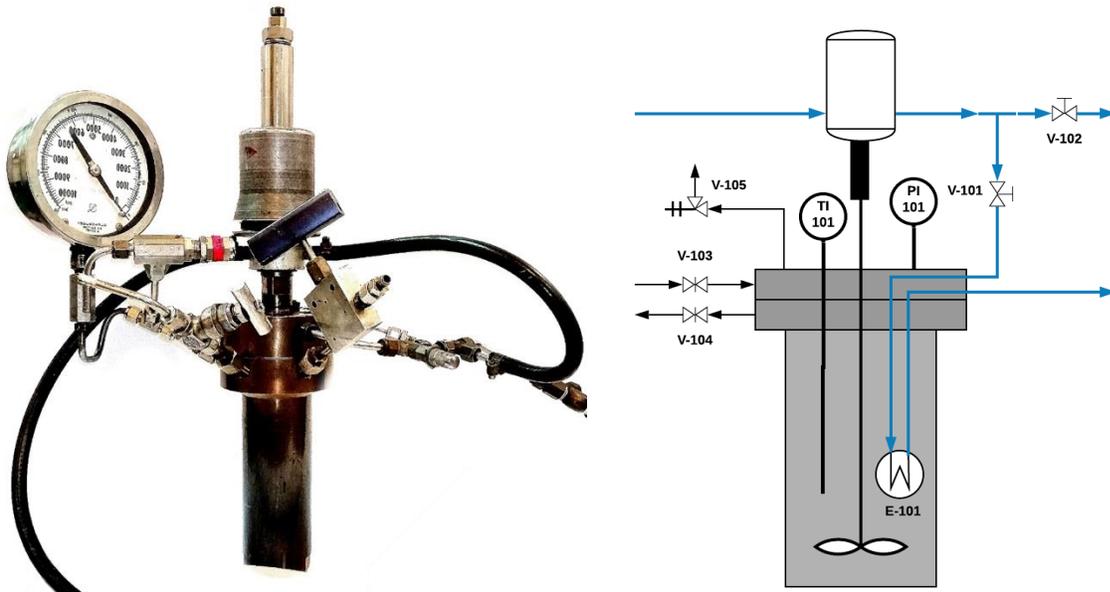
### 2.2.3 Sistema de reacción para Licuefacción Hidrotermal

Para las reacciones de LHT se empleó un reactor tipo Autoclave Engineers® de 280 mL con agitación magnética, sistema de calentamiento eléctrico y sistema de refrigeración interna con agua. En la Figura 2-3 se presenta el reactor empleado para la reacción y un esquema de este.

En total, se llevó a cabo 7 ensayos de licuefacción para obtener toda la fase acuosa necesaria para los ensayos posteriores. Antes y después de cada ensayo, el reactor se lavó con agua y con jabón, se cargó con 100 mL de agua destilada y se calentó hasta 300°C para posteriormente, por una despresurización súbita, limpiar las tuberías y válvulas de este. El horno se precalentó hasta 500°C mientras al reactor se cargaba la biomasa algal junto con agua desionizada. El reactor se selló y se introdujo al horno garantizando

que las válvulas V-101, V-103 y V-104 estuvieran cerradas y la válvula V-102 completamente abierta para permitir la refrigeración del sistema de agitación magnética.

Cada licuefacción hidrotermal se llevó a cabo a 350°C, por 30 minutos (a partir del momento en que se alcanza la temperatura de reacción) y con una carga de sólidos del 10% p/p (16.13 ± 0.02 g alga, 145.14 ± 0.25 g agua desionizada), y fue monitoreada por medio de los sensores de presión y temperatura, TI-101 y PI-101, respectivamente.



**Figura 2-3. Reactor tipo autoclave para reacciones de licuefacción hidrotermal.**

(Izquierda) Fotografía del reactor Autoclave Engineers® empleado. (Derecha) Esquema del reactor señalando las válvulas e instrumentos necesarios para la operación de este. La línea de proceso azul corresponde a la línea de agua empleada para la refrigeración del agitador y del reactor. Las válvulas V-101 a V-105 permiten refrigerar el reactor, refrigerar el agitador, presurizar el sistema, purgar/despresurizar el sistema y asegurar el reactor por alta presión, respectivamente.

Al finalizar la reacción, el reactor se retiró del horno y se permitió el paso de agua de refrigeración por el intercambiador de serpentín E-101, por medio de la acción de la válvula V-101, hasta que la presión interna del reactor censada por el manómetro PI-101 se encontrara por debajo del rango de medición de este (< 200 psi).

## 2.2.4 Separación de las fases resultantes de la LHT

Con el reactor a temperatura ambiente, el sistema se despresurizó abriendo la válvula V-104 y los productos gaseosos de la licuefacción hidrotermal se recolectaron en una trampa de agua, hasta que el reactor alcanzó la presión atmosférica.

Posteriormente, los sellos del reactor se retiraron y el contenido se transfirió a un papel filtro cualitativo (Whatman 1, 11  $\mu\text{m}$ ) para separar la fase acuosa resultante (filtrado) del biocrudo y los productos sólidos (retentato). La fase acuosa fue caracterizada según se describe en el Capítulo 3. Las paredes del reactor y el agitador se lavaron con diclorometano (DCM, Panreac®) y el material disuelto y suspendido se transfirió a un nuevo papel filtro. Una vez la fase acuosa de la LHT se obtuvo, los papeles filtro se lavaron continuamente con DCM (~ 1 L por reacción) hasta disolución completa del biocrudo. Los papeles filtro se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente dentro de una cabina de extracción y la fracción de sólidos se cuantificó como la diferencia de peso de los papeles filtro con y sin material carbonizado.

El diclorometano se retiró y recuperó del crudo mediante rotaevaporación a 18°C y una presión absoluta de 0.43 bar, en un rotaevaporador *Heidolph VV2011*. El crudo concentrado se refrigeró en frasco de vidrio hermético hasta posterior análisis.

El rendimiento de cada producto de la reacción ( $Y$ ) se determinó a partir de la (Ecuación 2-1, como la relación másica entre el producto obtenido y la masa inicial de alga alimentada el reactor en base seca.

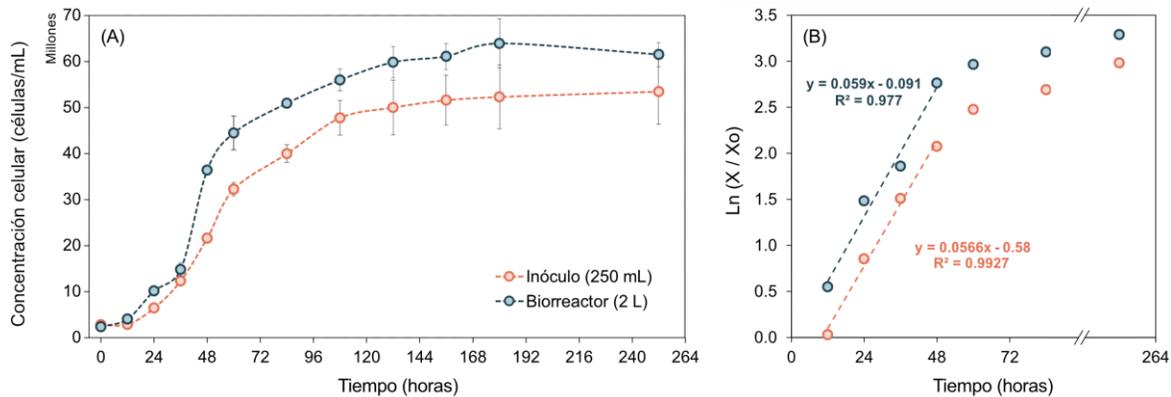
$$Y_i = \frac{\text{masa subproducto } i \text{ [g]}}{\text{masa alga} * (1 - \% \text{ humedad}) \text{ [g]}} * 100\% \quad (\text{Ecuación 2-1})$$

Donde  $i$  representa los subproductos de la LHT: biocrudo, sólidos o fracción acuosa.

## 2.3 Resultados y Análisis

### 2.3.1 Cinéticas de crecimiento

Durante las diferentes etapas de cultivo de la microalga *C. vulgaris*, se tomaron muestras diarias (cada 12 horas durante los primeros 2 días de cultivo) y la concentración celular se cuantificó mediante una cámara de Neubauer y empleando un método semiautomático de conteo con ayuda del programa ImageJ®. El crecimiento de la microalga sigue un modelo exponencial, en el que la fase exponencial comienza pasadas 12 horas de cultivo y tiene una duración aproximada de 36 y 48 horas para los cultivos de 2 L y 250 mL, respectivamente (Figura 2-4).



**Figura 2-4. Cinéticas de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.**

(A) Variación de la concentración celular para dos escalas diferentes de cultivo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos para  $n = 12$ . (B) Ajuste de modelo exponencial de crecimiento para cada escala de cultivo.  $X$  y  $X_0$  representan la concentración de microalgas (células/mL) en cada tiempo,  $t$ , y en el tiempo inicial,  $t_0$ , respectivamente.

Al ajustar los datos a una cinética de crecimiento exponencial (Ecuación 2-2), es posible estimar la velocidad específica de crecimiento de la microalga,  $\mu$ , y el tiempo de duplicación celular,  $t_d$ , como  $t_d = \ln(2)/\mu$ . Se tiene que, en promedio, la microalga *C. vulgaris* UTEX 2714, bajo las condiciones de cultivo estudiadas, tiene una velocidad específica de crecimiento de  $0.058 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de  $12.0 \pm 0.8 \text{ h}$ .

$$\frac{dX}{dt} = \mu t \rightarrow \ln(X/X_0) = \mu t + C \quad (\text{Ecuación 2-2})$$

Los datos obtenidos son similares a aquellos reportados por Bashan et al. (2016) para la misma especie de microalga. Adicionalmente, al final de cada periodo de cultivo se cuantificó el peso seco de la biomasa obtenida, y se determinó que la concentración de biomasa al final del décimo día de cultivo fue 0.64 g ps L<sup>-1</sup>, lo que se tradujo en una productividad de biomasa algal de 0.064 g ps L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (o 8.81 g ps m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup>, al considerar el área transversal de cultivo de la botella de Duran de 2 L). A pesar de que la productividad volumétrica obtenida para la cepa estudiada es similar a la productividad obtenida para la misma especie de microalga en otros estudios (Blair et al., 2014); productividades hasta 30 veces mayores, también han sido reportadas (Fu et al., 2012). Esta gran mejora se debe a múltiples factores; entre ellos, la naturaleza de la especie estudiada, la composición del medio de cultivo, las condiciones de cultivo y las condiciones de estrés que la microalga deba soportar.

En general, se tiene que la productividad de la microalga es más alta si (1) se suplementa CO<sub>2</sub> al aire de burbujeo (Yeh & Chang, 2012), (2) se alimenta de forma continua medio de cultivo para evitar limitación en el crecimiento por nitrógeno o fósforo (Griffiths et al., 2014; W. Kim et al., 2012), (3) se incrementa la intensidad de luz a lo largo del tiempo del cultivo para disminuir la limitación por efectos de penetración de luz en la columna de líquido (Fu et al., 2012), (3) se implementan estrategias de cultivo mixotrófico (Gonçalves et al., 2018).

El dato de productividad de biomasa es de importancia a la hora de cuantificar la viabilidad económica del proceso de producción de biocrudo a partir de microalgas; por lo que, si se aplicaran algunas estrategias para producir más microalgas, la productividad de biocrudo también mejoraría. A pesar de que los cultivos alcanzaban la fase estacionaria alrededor del quinto día de cultivo, los cultivos se mantuvieron por 5 días más con el fin de alcanzar condiciones de limitación de nutrientes (nitrógeno principalmente). Bajo estas condiciones, la microalga se estresa y como respuesta acumula una mayor cantidad de lípidos, como se ha demostrado en otros estudios (Benvenuti et al., 2015; Widjaja et al., 2009).

### 2.3.2 Caracterización de la microalga *C. vulgaris* UTEX 2714

La biomasa algal liofilizada se caracterizó por medio de diferentes métodos para determinar su contenido de humedad y cenizas, composición bioquímica, su composición elemental y su poder calorífico.

#### 2.3.2.1 Análisis proximal

En la Tabla 2-1 se presenta el porcentaje de humedad y cenizas de la microalga *C. vulgaris*, así como la composición de esta en base seca (peso seco, ps).

La microalga *Chlorella vulgaris* ha sido ampliamente estudiada y empleada para diversos fines, debido a su gran productividad y su composición bioquímica. De acuerdo a datos reportados en literatura, la composición de esta microalga varía entre 42–58 % proteínas, 5–40 % lípidos y 12–58 % carbohidratos, en base seca, de acuerdo a las condiciones de cultivo empleadas y al tiempo de cosecha (Cai et al., 2013; Safi, Zebib, et al., 2014b; Q. H. Shen et al., 2015). Los datos obtenidos para la microalga empleada en el presente estudio aparecen dentro de estos rangos.

**Tabla 2-1. Análisis proximal de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714\***

Humedad (% p/p)	Cenizas (% ps)	Carbohidratos (% ps)	Lípidos (% ps)	Proteínas (% ps)
4.07 ± 0.64	3.63 ± 0.02	11.64 ± 0.48	32.88 ± 4.76	41.71 ± 0.76

\* Los ensayos fueron desarrollados por triplicado y los resultados se expresan como el valor promedio ± desviación estándar (SD)

Como se aprecia en la Tabla 2-1, la suma de los componentes analizados de la biomasa es 93.3%, debido probablemente al uso de patrones en las técnicas colorimétricas empleadas, ya que solo permiten obtener un valor aproximado de la composición real de la biomasa. En primer lugar, el contenido de proteínas se determinó por medio del método de Bradford, empleando albúmina de suero bovino como estándar. De todos los métodos que existen para cuantificar proteínas, se ha encontrado que este método, además de ser práctico, arroja resultados similares a los obtenidos por el análisis de residuos de aminoácidos, considerado el método más confiable para cuantificar proteínas en biomasa

(Barbarino & Louren, 2005; Jones et al., 1989). Sin embargo, al ser un método colorimétrico que mide la concentración relativa de proteína, diferencias en la composición de diferentes proteínas entre muestras puede resultar en diferentes respuesta del reactivo de Bradford (Bio-Rad, 2006).

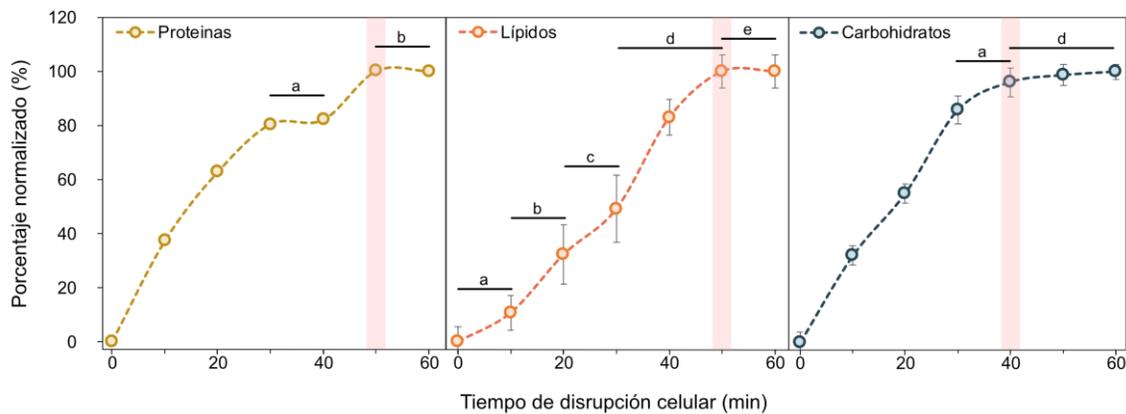
En segundo lugar, se tiene que el contenido de carbohidratos se determinó por medio del método fenol-sulfúrico, empleando glucosa como patrón estándar. A pesar de que este es el método más empleado para determinar el contenido total de carbohidratos en microalgas (M. R. Brown & Mccausland, 1998; Illman et al., 2000), la técnica tiene una precisión de  $\pm 2\%$  y la extensión de la reacción final depende de la estructura de los azúcares en la biomasa. En otras palabras, se encuentra que azúcares diferentes generan intensidades de color igualmente diferentes, por lo que se debe tratar de generar curvas de calibración con azúcares similares a los encontrados en las muestras (Dubois et al., 1956).

Finalmente, para el contenido de lípidos en la microalga se empleó el método de la sulfo-fosfo-vainillina, usando aceite de canola como estándar de calibración. Este método fue escogido por su practicidad y rapidez, en lugar del método tradicional de extracción con solventes planteado por Bligh & Dyer (1959). Este último método es preciso, debido a que permite cuantificar de forma gravimétrica el contenido total de lípidos en la biomasa, independientemente de su composición. Por el contrario, el método empleado para el presente trabajo es relativo a la composición del patrón empleado y de la muestra, por lo que el uso de diferentes aceites como patrón arroja diferentes resultados para una misma biomasa (Frings & Dunn, 1970; Joseph A Knight et al., 1972). Se empleó aceite de canola debido a que su perfil de ácidos grasos es similar al reportado para la microalga *C. vulgaris*, aun cuando este perfil varía en función de las condiciones de cultivo (Byreddy et al., 2016; Mishra et al., 2014).

Por otra parte, se determinó que el contenido de cenizas de la biomasa se encuentra dentro de los rangos reportados para microalgas de agua dulce y, además, es inferior al contenido reportado por otros autores para la misma microalga. Por ejemplo, Ekpo et al. (2016) emplearon *C. vulgaris* con un contenido de cenizas del 9.8% ps. para su licuefacción hidrotermal; mientras que Biller et al. (2012) usaron la misma microalga con un 7.0 % ps. De cenizas para el mismo fin. El bajo contenido de cenizas obtenido para la biomasa es ventajoso para la reacción de LHT, ya que se ha encontrado que altos contenidos de ceniza

(>30% ps) obstruyen la producción de biocrudo mientras se favorecen los rendimientos de producción de productos acuosos y sólidos. (W.-T. Chen et al., 2014). Además, cabe resaltar que el alto contenido de lípidos de la biomasa algal favorece igualmente la producción de biocrudo. Por ejemplo, la licuefacción de dos especies de microalga, con alto y bajo contenido de lípidos (59.9 y 14.1% ps, respectivamente), a 300°C, por 60 minutos y 15% sólidos iniciales, ocasiona un incremento en el rendimiento de producción de biocrudo del 27% (H. Li et al., 2014).

Para aplicar las técnicas colorimétricas para realizar el análisis proximal de la biomasa, la biomasa fue sometida previamente a un proceso de rompimiento celular por ultrasonido. Esta técnica de rompimiento, a pesar de ser una de las más costosas por consumo de energía (5.4 MJ kg<sup>-1</sup> alga ps, 0.291 \$ L<sup>-1</sup> aceite algal (Ansari et al., 2018)), es una de las que mayores rendimientos de extracción de lípidos, proteína y carbohidratos genera (Prabakaran & Ravindran, 2011; Safi, Ursu, et al., 2014). La disrupción total de la biomasa analizada se garantizó por medio de cinéticas de rompimiento, que permitieron establecer el umbral sobre el cual la concentración de cada biomolécula no varía con el tiempo de ultrasonación (Figura 2-5). Se estableció que para extraer en su totalidad los lípidos, carbohidratos y proteínas de la microalga analizada, se requería un tiempo de disrupción celular mínimo de 60 minutos.

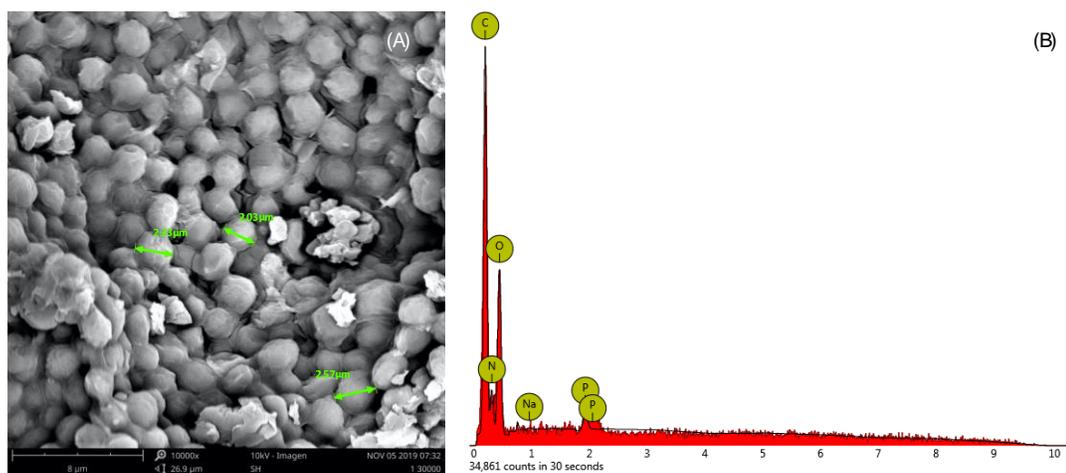


**Figura 2-5. Cinéticas de rompimiento por ultrasonación de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.** Los porcentajes de rompimiento se representan como la concentración de proteínas, lípidos y carbohidratos normalizada respecto a la concentración máxima obtenida de cada biomolécula. La franja roja señala el tiempo mínimo a partir del cual, estadísticamente, cada componente de la biomasa ha sido extraído en su totalidad. Las letras indican grupos que no son significativamente diferentes (Test ANOVA + Tukey,  $p < 0.05$ ) y las barras de error corresponden a la desviación estándar ( $n = 3$ ).

### 2.3.2.2 Composición elemental

La morfología de la microalga liofilizada, así como su composición elemental aproximada, se analizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Fluorescencia de Rayos X por Energía Dispersiva (EDS), respectivamente, empleando un microscopio *Phenom ProX*. La microalga empleada para la LHT conservó su forma esférica después de ser liofilizada y tenía un tamaño promedio de partícula de  $2.31 \pm 0.27 \mu\text{m}$  (Figura 2-6). Este diámetro implica una reducción del 56.4% respecto al diámetro de la microalga fresca, obtenido mediante análisis de imágenes por ImageJ®.

A pesar de que la biomasa fue lavada en repetidas ocasiones antes de ser liofilizada, algunas sales remanentes del medio de cultivo permanecieron adheridas a su superficie (Figura 2-6 A). La presencia de estas sales en la biomasa, de sodio y fósforo principalmente, no tiene un efecto significativo sobre la producción de biocrudo (Jiang & Savage, 2018).



**Figura 2-6. Morfología y análisis elemental de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.**

(A) Micrografía electrónica de barrido de la microalga liofilizada, resaltando el diámetro de algunas células presentes. Escala de  $8 \mu\text{m}$ . (B) Espectro de EDS global para la biomasa algal

En cuanto al análisis elemental de la biomasa, el espectro de EDS permite obtener un valor aproximado de esta para la microalga empleada (Tabla 2-2). Para el caso de muestras biológicas, la EDS no cuantifica el contenido de hidrógeno de la muestra, por lo que este se debe estimar por comparación respecto a datos reportados en la literatura. Teniendo en cuenta que, en la biomasa, el hidrógeno se encuentra ligado principalmente a átomos de

carbono y nitrógeno, su contenido en ella se puede determinar por medio de la relación C:H:N. Tomando resultados presentados por diferentes autores para la composición elemental de la microalga *Chlorella vulgaris* (véase Tabla 2-2), en promedio se tiene una relación 7.3:1.0:1.4.

A partir de los resultados de la EDS se tiene que, en total, carbono y el nitrógeno representan el 69.55% de la biomasa. Este porcentaje igualmente incluye el hidrógeno, por lo que, redistribuyendo el valor total respecto a la relación másica obtenida de la literatura, se estima una composición aproximada de hidrógeno del 7.13%.

A pesar de que la EDS no es el mejor método para determinar la composición elemental global de la biomasa, por una parte se tiene que estudios previos con la misma técnica demuestran que la variabilidad entre la composición elemental superficial e interna de muestras biológicas, no excede el 5% (Michalak et al., 2014) y por otra, los resultados estimados para la microalga estudiada se encuentran dentro de los intervalos reportados por Mandalam & Palsom (1998).

**Tabla 2-2. Composición elemental calculada y reportada para la microalga *Chlorella vulgaris*.**

Se presente la composición elemental para la microalga *C. vulgaris* UTEX 2714 según el espectro de EDS, así como la estimación de esta por medio de la relación C:H:N promedio de diferentes estudios.

Composición, % masico	Presente estudio		Literatura					
	EDS	Estimación	(Raheem et al., 2015)	(Rizzo et al., 2013)	(C. Chen et al., 2013)	(J. H. Yang et al., 2018)	(Kumar et al., 2014)	(K. Mandalam & O Palsom, 1998)
C	58.46	52.24	50.39	46.1	47.84	48.5	49.74	51.4 – 72.6
H	-	7.13	6.01	6.10	6.41	7.00	7.60	7.0 - 10.0
N	11.09	10.17	14.77	6.70	9.01	8.50	8.25	6.2 - 7.7
S	-	-	6.05	0.40	1.46	0.20	0.38	0.28 – 0.39
O *	25.71	25.71	22.78	19.1	25.0	35.0	34.03	11.6 – 28.5
P	4.14	4.14	-	-	-	0.80		1.0 – 2.0
Na	0.61	0.61						-

\* Oxígeno determinado por diferencia (100% - C - H - N - S - P - Na = O)

A pesar de que la EDS no es el mejor método para determinar la composición elemental global de la biomasa, por una parte se tiene que estudios previos con la misma técnica demuestran que la variabilidad entre la composición elemental superficial e interna de muestras biológicas, no excede el 5% (Michalak et al., 2014) y por otra, los resultados

estimados para la microalga estudiada se encuentran dentro de los intervalos reportados por Mandalam & Palsson (1998).

### 2.3.2.3 Poder calorífico

El poder calorífico superior (PCS) de la microalga liofilizada se determinó en un calorímetro IKA modelo C2000, y se obtuvo como resultado 20.12 MJ kg<sup>-1</sup> alga ps. Al contar con la composición elemental de la biomasa (Tabla 2-2), el PCS puede ser determinado por medio de la siguiente fórmula formulada por Demirbas (2016), donde C, H, O y N son respectivamente las fracciones másicas de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno en la biomasa:

$$\text{PCS [MJ kg}^{-1}\text{]} = \{33.5 \text{ C} + 142.3 \text{ H} - 15.4 \text{ O} - 14.5 \text{ N}\} * 10^{-2} \quad (\text{Ecuación 2-3})$$

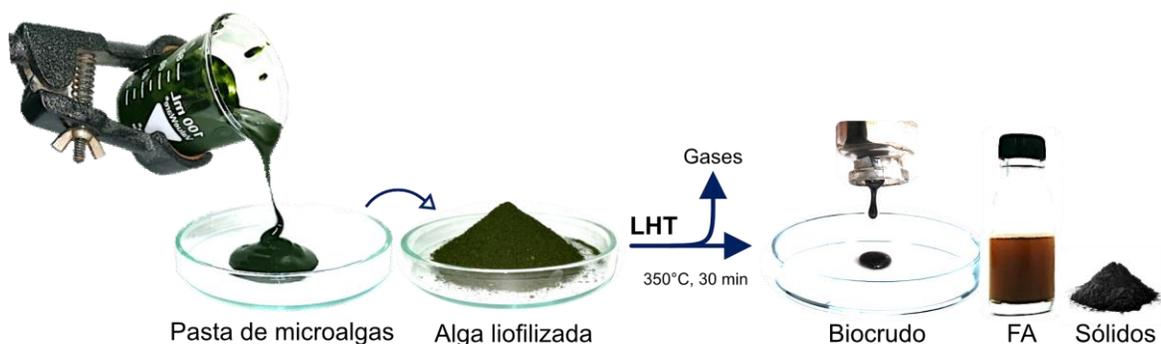
El PCS calculado, 22.21 MJ kg<sup>-1</sup>, es un 10.4% más grande que el valor medido experimentalmente, lo que indica que la composición elemental estimada para la biomasa no es precisa. Esto se puede deber a que (1) la composición elemental se basa en la relación C:H:N obtenida de la literatura, (2) el uso de EDS para determinar la composición de la biomasa, (3) la presencia de otras moléculas (cenizas) que no se contemplan al momento de cuantificar la composición elemental.

### 2.3.3 Licuefacción hidrotermal de microalgas

La LHT de la microalga *C. vulgaris* a condiciones constantes de reacción (350°C, 30 minutos de reacción y 10% sólidos ps) permitió la obtención de la fase acuosa necesaria para el proyecto, así como los demás productos esperados de la reacción (Figura 2-7).

En total, siete ensayos de LHT se llevaron a cabo y los rendimientos de los productos obtenidos se presentan en la Tabla 2-3. La masa de productos gaseosos generados se cuantificó por aproximación, a partir del volumen de agua desplazado por los gases una vez el reactor se despresurizó a temperatura ambiente. Se asumió que la fracción gaseosa era mayoritariamente hidrógeno, metano y dióxido de carbono, con un peso molecular promedio de 33.99 g mol<sup>-1</sup>, calculado según la composición de este subproducto

presentada por diversos autores (T. M. Brown et al., 2010; Jena, Vaidyanathan, et al., 2011a; Valdez et al., 2012).



**Figura 2-7. Productos de reacción de la licuefacción hidrotermal de la microalga *Chlorella vulgaris*.**

La LHT se realizó a las condiciones descritas en la figura, cargando al reactor  $16.13 \pm 0.02$  g de alga liofilizada y  $161.1 \pm 0.3$  g de agua desionizada. FA = Fase acuosa

**Tabla 2-3. Rendimiento de productos de la LHT respecto a la biomasa algal alimentada al reactor**

Ensayo	Gases (% ps)	Biocrudo (% ps)	Sólidos (% ps)	FA <sub>s</sub> (% ps)*	Balance masa (%)
LHT-1	5.48	30.00	15.03	9.29	59.80
LHT-2	6.79	36.10	15.59	11.16	69.64
LHT-3	6.01	37.74	14.48	9.15	67.38
LHT-4	7.37	35.76	13.81	9.52	66.46
LHT-5	9.51	43.78	16.88	10.30	80.47
LHT-6	9.31	39.62	15.59	11.04	72.56
LHT-7	8.35	39.76	15.67	9.66	73.44
<b>Promedio</b>	$7.55 \pm 1.57$	$37.54 \pm 4.29$	$15.29 \pm 0.98$	$10.02 \pm 0.83$	$70.00 \pm 6.50$

\* Rendimiento determinado a partir del contenido total de compuestos solubles en la fase acuosa

Una fracción de cada fase acuosa (FA) se evaporó completamente, empleando un baño de agua hirviendo, con el fin de cuantificar los compuestos solubles totales y el rendimiento respectivo. Es posible que algunos compuestos orgánicos volátiles se hubieran perdido durante el proceso de secado de la fase acuosa, por lo que el rendimiento real es mayor al obtenido. Al mezclar las fases acuosas por partes iguales, se obtuvo una concentración promedio de compuestos solubles en la fase acuosa de 1.13% p/p. Los rendimientos

obtenidos de cada fracción son similares a valores reportados por otros autores (H. Li et al., 2014; López Barreiro et al., 2013a; López Barreiro, Riede, et al., 2015; Guo Yu et al., 2011).

### **2.3.3.1 Balance de materia**

El balance de materia para la licuefacción varía entre 59.8 y 80.47%, con un valor promedio del 70.0%. Las pérdidas durante el desarrollo de cada reacción se deben a errores experimentales durante la manipulación y separación de las fases gaseosa y acuosa. Por un lado, durante la separación de los gases, parte de estos se escapaban al momento de su recolección. Por otra parte, los productos acuosos no contados se perdían durante el proceso de filtración, ya que parte de los productos acuosos se quedaron atrapados (adsorbidos) en el filtro de celulosa, haciendo imposible su recuperación.

La variabilidad entre réplicas puede deberse en general a diferencias en las rampas de calentamiento del reactor durante la LHT. Estas diferencias experimentales se debieron a la falta de contacto entre la termocupla que sensaba la temperatura y las paredes del reactor. Particularmente, la velocidad de calentamiento tiene un efecto sobre el rendimiento de producción de biocrudo. En la LHT-1, la velocidad de calentamiento hasta alcanzar la temperatura de reacción fue menor ( $6.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) en comparación al promedio de las demás replicas experimentales ( $8.9\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ), lo que se tradujo en el menor de los rendimientos de biocrudo presentados en la Tabla 2-3.

Esto se debe a que una mayor velocidad de calentamiento favorece el desarrollo de reacciones benéficas durante la LHT (degradaciones hidrolíticas y pirolíticas) sobre reacciones indeseadas (de crackeo y polimerización) que generan que el biocrudo formado se descomponga en fracciones más ligeras (Brand et al., 2014).

## **2.3.4 Caracterización del biocrudo**

### **2.3.4.1 Poder calorífico**

El poder calorífico del biocrudo obtenido se determinó en un calorímetro IKA modelo *C2000 Basic*, obteniendo un poder calorífico superior (PCS) promedio de  $34.46 \pm 1.78\text{ MJ kg}^{-1}$

biocrudo (7 réplicas). Este resultado implica una recuperación de energía (RE) del 64.3%, respecto a la biomasa algal, cuando se compara el contenido energético de los dos en términos de PCS, por medio de la (Ecuación 2-4, donde  $Y_{\text{biocrudo}}$  es el rendimiento de formación de biocrudo).

$$RE = \frac{\text{PCS biocrudo} * Y_{\text{biocrudo}}}{\text{PCS microalga}} \quad (\text{Ecuación 2-4})$$

A pesar de ser menor al poder calorífico del petróleo ( $42 \text{ MJ kg}^{-1}$ ), debido probablemente a un mayor contenido de oxígeno en el biocrudo, el poder calorífico del biocrudo algal obtenido se encuentra dentro de los valores esperados según diferentes estudios. Ross et al. (2011) llevaron a cabo LHT de diferentes microalgas y concluyeron que el PCS del biocrudo obtenido de estas a  $350^{\circ}\text{C}$  variaba entre  $34.2$  y  $37.2 \text{ MJ kg}^{-1}$ . Yu et al. (2011) reportaron que el PCS del biocrudo de *Chlorella* estaba entre un rango de  $34.25$  y  $38.54 \text{ MJ kg}^{-1}$  para licuefacciones llevadas a cabo entre  $260$  y  $350^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.5 Caracterización de la fase acuosa

Las fases acuosas resultantes de las licuefacciones previas se mezclaron por partes iguales para conformar la fase acuosa de trabajo de la presente investigación. La nueva fase acuosa se caracterizó y los resultados se resumen en la Tabla 2-4.

La conductividad de la fase acuosa es el resultado de la liberación de iones durante la hidrólisis de los componentes de la biomasa durante la LHT. Durante la reacción, tanto la carga inicial de sólidos como la temperatura tienen un efecto positivo sobre la conductividad de la FA. Extrapolando los datos obtenidos en un estudio previo sobre la LHT de *C. vulgaris* entre  $210$  y  $290^{\circ}\text{C}$ , con un 10% de sólidos y un tiempo de reacción de 30 minutos (Tantiphiphatthana et al., 2015); se obtiene una conductividad de  $2.01 \text{ S m}^{-1}$ , para la licuefacción a  $350^{\circ}\text{C}$ . La diferencia entre el dato extrapolado y el obtenido experimentalmente se puede deber a diferencias en la composición de la biomasa, así como a efectos no estudiados del tiempo de residencia sobre la conductividad de la FA.

**Tabla 2-4. Caracterización de la fase acuosa resultante la LHT de la microalga *C. vulgaris* UTEX 2714.**  
Valores promedio para tres replicas  $\pm$  SD. Métodos referenciados según la guía de Métodos Estándar para el Análisis de Agua y Agua Residual de la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 1999)

Parámetro		Método	Ref. APHA
<b>Conductividad</b>	33.8 mS cm <sup>-1</sup>	Conductimetría en agua	2510 B
<b>pH (a 25°C)</b>	8.48	Potenciometría	4500-H <sup>+</sup> B
<b>SDT</b>	11,300 ppm	Secado en baño de agua	TDS-2540
<b>DQO</b>	26,248 mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	Reflujo cerrado y volumetría	COD-5220 C
<b>COT</b>	5,202 $\pm$ 65 ppm	Combustión y análisis NDIR	TOC-5310 B
<b>Nitrógeno total (NT)</b>	5,769 $\pm$ 30 ppm	Combustión y quimioluminiscencia	---
<b>Amonio (NH<sub>4</sub>-N)</b>	1,662 $\pm$ 20 ppm	Fenato	4500-NH <sub>3</sub> F
<b>Nitrato (NO<sub>3</sub>-N)</b>	1,579 $\pm$ 24 ppm	Espectrofotometría UV	4500-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> B
<b>Fosfato (PO<sub>4</sub>-P)</b>	1,420 $\pm$ 12 ppm	Cloruro estanoso	4500-P D
<b>Fenoles</b>	83.9 $\pm$ 2.3 ppm	Amino antipirina	5530-Phenols A

De igual forma, el pH de la fase acuosa está relacionado positivamente con la temperatura de reacción. El valor de pH ligeramente alcalino concuerda con los resultados presentados por otros autores. Patel et al. (Patel et al., 2016) señalan que por encima de 300°C el pH mínimo que se obtiene en la fase acuosa es 8.0, independientemente del tiempo de reacción y la concentración de sólidos. Este incremento en el pH se atribuye a la reducción de la concentración de nitrato, que en solución forma soluciones ácidas; y al incremento simultáneo de la concentración de amonio debido a la degradación de proteínas.

Por otra parte, se ha reportado que a las mismas condiciones de reacción empleadas en este estudio, durante la LHT de *C. vulgaris* se recupera más del 23% del carbono de la biomasa en la fase acuosa, en forma de carbono orgánico total, principalmente (P. Biller & Ross, 2011). Según datos de la literatura, el TOC medido en la fase acuosa de la licuefacción de *C. vulgaris* (obtenida a 350 °C, 10% sólidos y 60 minutos) es de 12,767 ppm (P Biller et al., 2012; Cherad et al., 2016c). Se cree que la concentración de TOC obtenida en el presente estudio es menos de la mitad del valor reportado, debido a la diferencia en el contenido de lípidos de la biomasa para los dos casos (21.5% ps para la microalga empleada por los otros autores y, 33% ps para la microalga UTEX 2714 de la presente investigación).

En cuanto al contenido de nutrientes, la mayoría del nitrógeno y del fósforo de la biomasa se encuentran concentrados en la fase acuosa como amonio/nitrato y fosfato, respectivamente. Biller et al. (2012) obtuvieron una concentración de nitrógeno total de 6,888 ppm al licuar *C. vulgaris* a las mismas condiciones reactivas de este estudio. Su resultado resulta ser similar al obtenido para la presente fase acuosa. Sin embargo, en su estudio, aproximadamente el 86% del nitrógeno se encuentra como amonio; mientras que, en nuestra investigación, tan solo el 25% del nitrógeno está en esa forma. Esto se puede deber al mayor contenido proteico de su biomasa (55% ps) puesto que el amonio es el principal producto de su degradación. Lo que respecta al fósforo, en el mismo estudio se obtuvo una concentración de fosfato de 1,121 ppm  $\text{PO}_4^{3-}\text{P}$ , que nuevamente resulta ser comparable con la obtenida en este trabajo.

En general, se identifica el potencial que tiene la fase acuosa obtenida de la LHT de la microalga *C. vulgaris* UTEX 2714 como fuente de carbono, nitrógeno y fósforo para generar nueva biomasa algal; sin embargo la concentración de fenol obtenida es lo suficientemente alta como para inhibir el crecimiento de microalga (Scragg, 2006). Por lo que, el tratamiento de la FA es necesario para remover estos compuestos tóxicos para las algas y así, continuar con el ciclo productivo de biocrudo.

## 2.4 Conclusiones

La productividad promedio de biomasa obtenida en los cultivos a nivel de 2 L de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 fue de 0.064 g ps  $\text{L}^{-1} \text{dia}^{-1}$ , correspondiente a una productividad por unidad de área de 8.81 g ps  $\text{m}^{-2} \text{dia}^{-1}$ . Bajo condiciones autotróficas, la biomasa tuvo una composición de lípidos proteínas y carbohidratos del 32.88, 41.71 y 11.64%, respectivamente. El contenido lipídico de la biomasa valida el uso de esta especie de microalga para la producción de biocombustibles debido a que la productividad de lípidos se compara favorablemente al valor de 10.5 ton  $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ , correspondiente al aceite de palma (Corley, 1998). A pesar de que se emplearon técnicas colorimétricas para el análisis proximal de la biomasa, la composición obtenida reflejó resultados presentados por otros autores y el balance de materia se cumplió en un 93%, indicando que la selección de los patrones de calibración para cada técnica fue adecuada. De forma paralela se

encontró que al emplear la ultrasonación como método de disrupción celular, a 20 kHz y un porcentaje de amplitud del 60%, el tiempo mínimo de disrupción debe ser 50 minutos para garantizar la disrupción total de la microalga. La licuefacción hidrotérmica de la biomasa cosechada resultó en un rendimiento de producción de biocrudo del 37.54% del peso seco de la biomasa. El poder calorífico del biocrudo ( $34.46 \text{ MJ kg}^{-1}$ ) fue un 18% inferior al poder calorífico del petróleo fósil y permitió una recuperación energética de 64.3% de la energía contenida en la biomasa algal liofilizada. Respecto a las otras fases resultantes de la LHT, se obtuvieron rendimientos de fase acuosa, sólidos y gases del 10.02, 15.29 y 7.55% del peso seco de la biomasa, respectivamente. El balance de materia de la reacción cerró en un 70% debido a pérdidas experimentales de materia (fugas, evaporación de agua, adsorción de compuestos en filtros, entre otras). Finalmente, la caracterización de la fase acuosa permitió encontrar valores equivalentes de conductividad, pH, DQO y fosfatos a aquellos presentados en publicaciones previas, para la misma microalga bajo las mismas condiciones reactivas. Respecto a la concentración de TOC y las diferentes especies de amonio, se concluyó que el mayor contenido lipídico de la biomasa empleada ocasiona menores concentraciones de estos nutrientes. En general, la biomasa tiene potencial para ser empleada como fuente de nutrientes en cultivos de microalgas, pero debido a la presencia de fenoles, un tratamiento previo es necesario.

### **3.Oxidación hidrotermal con peróxido de hidrógeno de la fase acuosa resultante de la LHT de microalgas**

En el presente capítulo, se estudia la oxidación hidrotermal con peróxido de la fase acuosa proveniente de la LHT de microalgas. Específicamente, se evalúa el efecto del tiempo de residencia y la concentración del agente oxidante (peróxido de hidrógeno) sobre la calidad general del efluente tratado. La calidad del agua se evalúa en términos de nutrientes en solución, que puedan ser valorizados/recirculados para la producción de nueva biomasa algal (nitrógeno y fósforo, principalmente) y en términos del contenido de materia orgánica (carbono) y de compuestos tóxicos (fenoles).

Con el tratamiento hidrotermal propuesto se pretende reducir la concentración de estos últimos, puesto que su alta concentración inhibe el crecimiento de las microalgas. El objetivo final es reducir la concentración de componentes tóxicos mientras la mayor cantidad de nutrientes se mantienen en solución, para así, producir más biomasa algal por medio de la recirculación de la fase acuosa tratada y entonces, cerrar el ciclo de producción de biocrudo a partir de microalgas desde un enfoque de sostenibilidad.

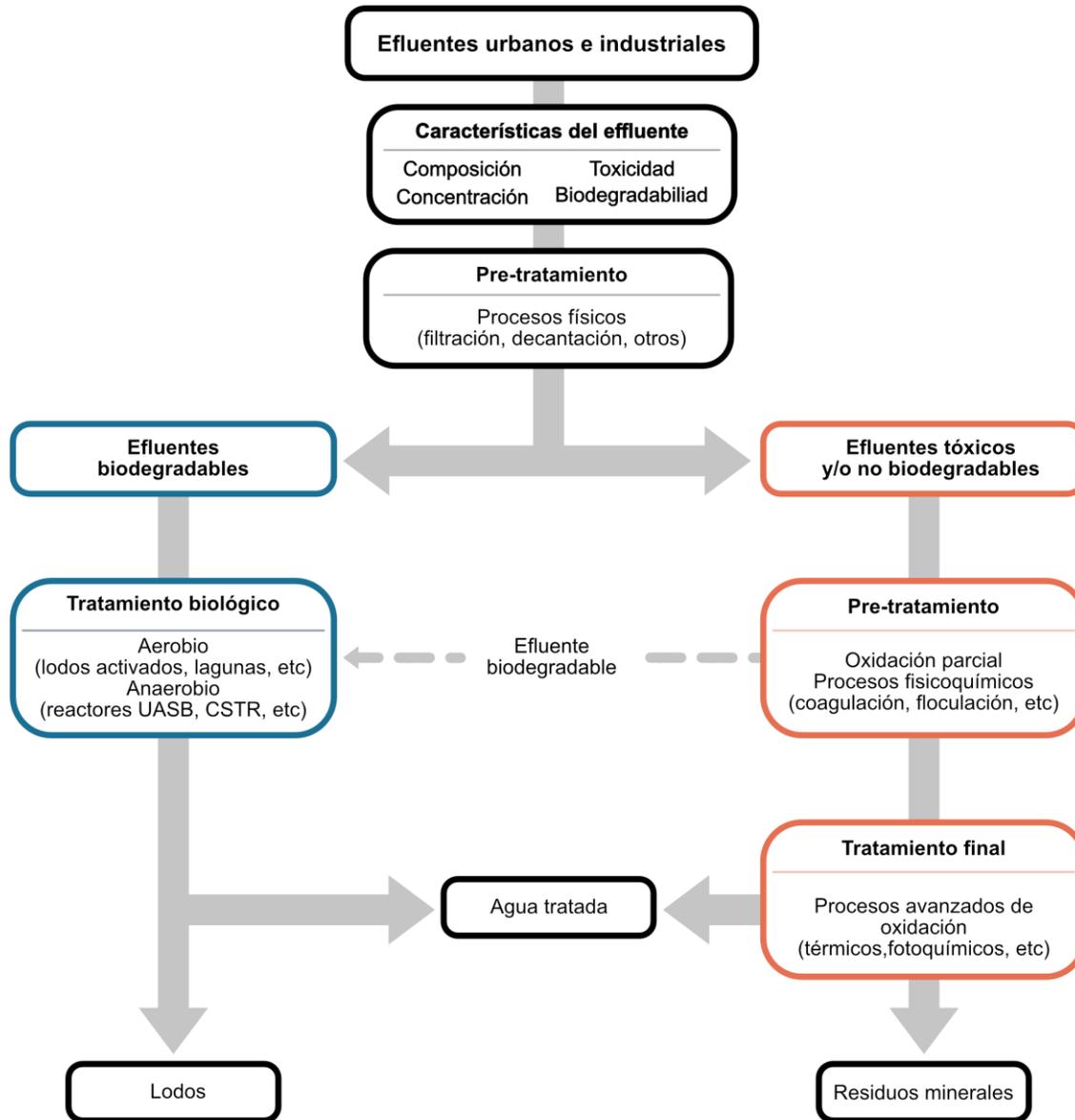
## 3.1 Introducción

El interés por el tratamiento de aguas residuales es cada vez más importante, dada la preocupación mundial por la creciente contaminación del medio ambiente; particularmente del aire, del suelo y de los cuerpos de agua superficiales y subterráneos. Las aguas residuales resultan de la alteración del agua por actividades humanas, como consecuencia de su uso con fines domésticos, industriales, artesanales y agrícolas, entre otros. Estas aguas se consideran contaminadas y no pueden verterse al medio ambiente sin un tratamiento previo. Esto se debe a que, por una parte, la capacidad de depuración natural de materia orgánica de los cuerpos de agua es limitada. Al superar esta capacidad, el oxígeno disuelto es consumido y el desarrollo de vida acuática se vuelve insostenible. Por otra parte, la presencia de compuestos recalcitrantes en el agua residual, en la mayoría de los casos, resulta tóxica para la flora y fauna acuática.

Las aguas residuales se pueden clasificar en domésticas, industriales y urbanas. Las primeras, son de composición relativamente constante y corresponden al agua residual que se obtiene de actividades domésticas (uso en cocina, baños, lavado, otros). El segundo tipo de agua residual, a diferencia del primero, posee una composición variable definida por el tipo de industria en cuestión. La diversidad de este tipo de aguas (de carácter mineral, orgánico, radioactivo, con presencia de contaminantes emergentes, etc.) ha motivado el desarrollo de nuevos métodos de tratamiento de aguas residuales, ya que los métodos biológicos convencionales, aplicados para el tratamiento de efluentes domésticos, no pueden ser empleados en gran parte de los casos. En el caso particular del presente estudio, la fase acuosa de LHT puede ser considerada como un agua residual industrial de carácter orgánico. Finalmente, los efluentes urbanos son el conjunto de aguas residuales domésticas e industriales junto con efluentes de actividades colectivas y comerciales.

En general, la eficacia de los tratamientos de agua residual varía en función de la concentración del contaminante de interés, la concentración de otras sustancias y la forma en que se presentan los compuestos. Por estos motivos conviene conocer de antemano y en detalle el origen del efluente y la composición de este. La elección de una estrategia de tratamiento requiere una investigación específica para cada tipo de efluente, sobre su

naturaleza y los factores externos que pueden intervenir (disposición de residuos resultantes del tratamiento, aspectos económicos, contexto legal, etc.). La Figura 3-1 muestra un diagrama de flujo de las diferentes técnicas que se pueden utilizar para la remoción de contaminantes orgánicos presentes en aguas urbanas e industriales.



**Figura 3-1. Diagrama de flujo de los diferentes procesos que pueden ser empleados para el tratamiento de aguas urbanas e industriales.**

*Los efluentes tóxicos y/o no biodegradables pueden ser tratados por métodos biológicos convencionales si el agua residual es pretratada. El agua se trata en la mayoría de los casos con fines de descarga final (de acuerdo con normatividades vigentes) o para reúso en procesos industriales.*

En general, la eficacia de los tratamientos de agua residual varía en función de la concentración del contaminante de interés, la concentración de otras sustancias y la forma en que se presentan los compuestos. Por estos motivos conviene conocer de antemano y en detalle el origen del efluente y la composición de este. La elección de una estrategia de tratamiento requiere una investigación específica para cada tipo de efluente, sobre su naturaleza y los factores externos que pueden intervenir (disposición de residuos resultantes del tratamiento, aspectos económicos, contexto legal, etc.). La Figura 3-1 muestra un diagrama de flujo de las diferentes técnicas que se pueden utilizar para la remoción de contaminantes orgánicos presentes en aguas urbanas e industriales.

Como se aprecia, en la Figura 3-1, cuatro tipos de procesos pueden ser empleados para el tratamiento de aguas residuales:

- Procesos físicos, como la adsorción (Baup et al., 2000; Gamby et al., 2001) y la filtración con membranas (Chang & Kim, 2005), empleados principalmente como métodos de pre o postratamiento de aguas residuales y que se enfocan en la remoción de contaminantes específicos por medio de un cambio de fase.
- Procesos biológicos, que aprovechan la capacidad de diferentes microorganismos para la remoción de contaminantes orgánicos en el agua residual. El método más empleado es el lodos activados, que aunque efectivos para el tratamiento de aguas residuales urbanas, genera grandes cantidades de residuos (lodos) y resultan inviables para remediar aguas tóxicas, con demandas químicas de oxígeno (DQO) superiores a  $10 \text{ g L}^{-1}$  o con presencia de sustancias no biodegradables (Crini & Lichtfouse, 2019; Fuhs & Chen, 1975; Gernaey et al., 2004).
- Procesos fisicoquímicos, basados en reacciones químicas como la oxidación a temperatura ambiente (empleando cloro u ozono) (Kasina et al., 2019; J. Kim et al., 2003; P. Xu et al., 2002) y la incineración; o en reacciones fisicoquímicas como la coagulación y la precipitación (Ciabatti et al., 2010; Dhankhar & Hooda, 2011; Verma et al., 2012). Estos métodos resultan efectivos para tratar aguas con bajas concentraciones de DQO, pero presentan la desventaja de generar fracciones con altas concentraciones de contaminantes que aún deben ser tratadas.

• Procesos avanzados de oxidación, a alta temperatura y presión, adecuados para cargas de DQO de 10 a 100 g L<sup>-1</sup>, en los cuales los desechos orgánicos y tóxicos pueden ser tratados, y la recuperación de nutrientes y energía es factible.

- **Procesos hidrotermales de oxidación**

Los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO), son aquellos empleados para remediar y eliminar componentes orgánicos complejos y tóxicos de aguas residuales, cuando la naturaleza del efluente no permite su tratamiento por métodos convencionales, como lo es el caso de la fase acuosa resultante de la licuefacción hidrotermal de microalgas. Estos procesos se basan en la generación y acción de especies altamente oxidantes (radicales hidroxilos), para transformar la estructura de química, y en la mayoría de los casos la fase, de los contaminantes presentes en el agua (Glaze et al., 1987). La obtención de los radicales oxidantes puede suceder por medios químicos, térmicos, fotocatalíticos y electroquímicos. El presente trabajo se enfoca particularmente en el proceso de oxidación hidrotermal, con peróxido de hidrógeno como agente oxidante.

En general, los procesos hidrotermales para el tratamiento de aguas residuales que ocurren en inmediaciones del punto crítico del agua se pueden denominar Oxidación por Vía Húmeda (WAO, *Wet Air Oxidation*) u Oxidación en Agua Supercrítica (SCWO, *Supercritical Water Oxidation*), si las condiciones de reacción están por debajo o por encima del punto crítico del agua, respectivamente. Por un lado, la oxidación por vía húmeda busca mejorar el contacto entre el oxígeno molecular y la materia orgánica a oxidar por medio de condiciones moderadas de temperatura y presión (Zimmermann, 1954). Por el otro, la SCWO se vale de las propiedades del agua supercrítica para mejorar la solubilidad del oxígeno y llevar a cabo una oxidación homogénea (Bermejo & Cocero, 2006).

Las ventajas técnicas y medioambientales de estos procesos son los que han permitido su desarrollo a lo largo de los años. De hecho, con temperaturas de trabajo relativamente bajas (entre 150 y 500°C) en comparación con las utilizadas durante la incineración de residuos orgánicos, estos procesos no generan emisiones de NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub> o incluso dioxinas. La ausencia de humos reduce considerablemente la necesidad de postratamiento.

Además, estos procesos permiten, por una parte, trabajar con residuos húmedos sin recurrir a pretratamientos a menudo costosos (secado, estabilización, etc.), y por otra, la recuperación de sales (nutrientes) presentes en el agua tratada. Finalmente, la naturaleza exotérmica de la reacción de oxidación involucrada hace posible la recuperación de energía directamente en el sitio de operación.

**Tabla 3-1. Principales características de la oxidación por vía húmeda y en agua supercrítica para el tratamiento de aguas residuales.**

	Oxidación por Vía Húmeda (WAO)	Oxidación en Agua Supercrítica (SCWO)
<b>Temperatura</b>	150 – 300 °C	450 – 600 °C
<b>Presión</b>	30 – 300 bar	250 – 300 bar
<b>Características</b>	Solubilidad total de compuestos orgánicos y parcial del oxígeno.	Solubilidad parcial de compuestos orgánicos y casi total del oxígeno.
<b>Residuos que tratar</b>	Lodos, efluentes acuosos	Solventes halogenados y no halogenados, residuos farmacéuticos, hidrocarburos, compuestos fenólicos
<b>Tiempo de reacción</b>	30 – 60 min	30 – 60 seg
<b>Reducción de la DQO</b>	70 – 99%	> 99%
<b>Subproductos gaseosos</b>	CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , trazas de CO	CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
<b>Subproductos acuosos</b>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , minerales, óxidos metálicos	HCl, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , minerales, óxidos metálicos, ácidos orgánicos ligeros

Más allá de las diferencias tecnológicas entre los dos procesos (Tabla 3-1), la principal diferencia entre la WAO y la SCWO reside en la naturaleza de los residuos a los que se adaptan, lo que los hace especialmente complementarios. Así, para el tratamiento de efluentes acuosos o lodos de plantas de tratamiento con alta DQO, la oxidación por vía húmeda permite obtener un efluente fácilmente biodegradable; mientras que la oxidación en agua supercrítica, aunque más eficiente pero más costosa, se ajusta mejor para la eliminación de residuos tóxicos (fitosanitarios, hidrocarburos, disolventes organoclorados, etc.).

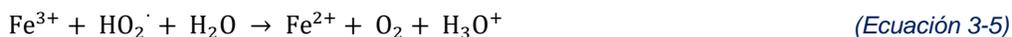
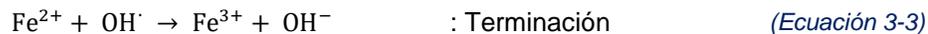
En cuanto a los productos generados durante los tratamientos, la mineralización de las cadenas de carbono en el agua residual conduce a la formación de  $\text{CO}_2$  en ambos casos. Al mismo tiempo, los minerales, metales y heteroátomos (Cl, N, S, etc.) se encuentran en la fase acuosa en forma de ácidos minerales ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y orgánicos (acético y fórmico), amoníaco o incluso óxidos. Este confinamiento en la fase acuosa ofrece una clara ventaja a estos métodos de tratamiento debido a su capacidad para contener estos elementos en una forma y en una fase que se puede tratar fácilmente mediante procesos fisicoquímicos convencionales o biológicos convencionales. Este último aspecto también posiciona estos procesos en el campo de la valorización de residuos mediante la recuperación de metales (nobles en el caso de los catalizadores, por ejemplo), o nutrientes (para la producción de biomasa).

- **Oxidación hidrotermal con peróxido de hidrógeno**

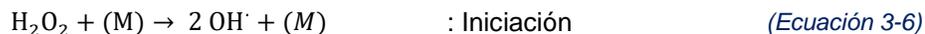
El uso de oxígeno molecular como agente oxidante genera que los procesos hidrotermales de oxidación estén gobernados por mecanismos de transferencia de masa, ya que las principales reacciones de oxidación de materia orgánica ocurren en el seno del líquido. La oxidación hidrotermal con peróxido elimina los problemas de transferencia de masa al emplear un oxidante líquido. En este caso, el radical hidroxilo se genera por descomposición del peróxido de hidrógeno, por lo que la eficiencia de oxidación de materia orgánica de estos procesos es fuertemente dependiente de la concentración del oxidante en el medio reactivo.

De manera análoga a los procesos hidrotermales mencionados anteriormente, la oxidación con peróxido puede ocurrir en condiciones subcríticas (Oxidación con peróxido por vía húmeda o WPO, por sus siglas en inglés) o en condiciones supercríticas (Oxidación en agua supercrítica con peróxido). En condiciones subcríticas, la WPO necesita de un catalizador, como el reactivo de Fenton, para la generación de los radicales oxidantes. El tratamiento químico con reactivo de Fenton es una técnica que consiste en iniciar reacciones de descomposición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por sales metálicas (en particular metales de transición) para generar especies radicales ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ , etc.) reactivas (Lin & Lo, 1997). Estos iones metálicos pueden estar presentes en el efluente a tratar, en forma libre o como complejos. La descomposición del peróxido de hidrógeno por

iones ferrosos fue propuesta inicialmente por Haber y Weiss (1932), y sigue los siguientes mecanismos de reacción de tipo radical:



En el caso de la oxidación con peróxido en agua supercrítica, es esta última (M) la encargada de iniciar los mecanismos de reacción para la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, por medio de reacciones radicales (Croiset et al., 1997)



En estos procesos, además de la temperatura de reacción y la presión de operación, el tiempo de residencia y la concentración del oxidante son otros parámetros que se deben tener en cuenta. Autores como Croiset et al. (1997), establecen que la relación superficie/volumen es otra variable a considerar, puesto que en las inmediaciones de la pared del reactor, la presencia de metales favorece la reacción de descomposición del peróxido. Cuando se habla de la temperatura de reacción, se tiene que la eficiencia de los procesos es mayor cuanto más alta es la temperatura, y en general los tiempos de reacción requeridos para la oxidación son menores. Finalmente, la concentración de oxidante es importante, y usualmente la cantidad estequiométrica es suficiente para oxidar la materia orgánica.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Caracterización de la fase acuosa

Una mezcla por volúmenes iguales se realizó a partir de cada una de las fases acuosas obtenidas previamente durante la LHT de microalgas, con el fin de realizar los tratamientos planteados a partir de una fracción acuosa de composición constante. La fase acuosa compuesta se alicuotó en tubos Falcon® de 50 mL y se congeló a  $-20.0^{\circ}\text{C}$  para preservar sus propiedades hasta los tratamientos hidrotermales. Diferentes métodos se emplearon para la caracterización fisicoquímica de la fase acuosa antes y después de cada uno de los tratamientos planteados.

#### 3.2.1.1. Carbono Orgánico Total (COT) y Nitrógeno Total (NT)

El carbono orgánico total de las muestras acuosas se determinó como la diferencia entre el carbono total y el carbono inorgánico total de las mismas, empleando un analizador elemental *Analytik Jena Multi N/C 3100*, que por medio de un sensor de infrarrojo no dispersivo (NDIR) permitió cuantificar el  $\text{CO}_2$  generado durante la combustión de la muestra. De forma paralela, el equipo permitió cuantificar el nitrógeno total de las muestras con la ayuda de un detector quimioluminiscente (CLD) que determinaba la cantidad de óxido de nitrógeno generado.

#### 3.2.1.2. Amonio ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) y Nitratos ( $\text{NO}_3\text{-N}$ )

El amonio presente en las muestras se determinó por absorbancia empleando el método 'azul indofenol' resultante de la reacción entre amoníaco, fenol e hipoclorito en un medio alcalino. El contenido de nitratos en la fase acuosa se determinaron por espectrofotometría ultravioleta (UV) midiendo absorbancia de la muestra a 230 nm y realizando una corrección por materia orgánica disuelta, a 275 nm (Rodríguez, 2015) (Anexos F-G).

### 3.2.1.3. Fosfatos solubles

El contenido total de fosfatos se determinó empleando el método de cloruro estanoso (Sanabria, 2004), en el cual, las muestras son tratadas con molibdato de amonio y cloruro estanoso, que reaccionan con los ortofosfatos generando compuestos de color azul que pueden ser leídos a una longitud de onda de 690 nm (Anexo H).

### 3.2.1.4. Fenoles

Los compuestos fenólicos se determinaron empleando el método colorimétrico de la amino-antipirina, el cual sirve para determinar fenol y compuestos fenólicos sustituidos en las posiciones *orto* y *meta*. Bajo condiciones apropiadas de pH el método cuantifica fenoles sustituidos en la posición *para* con radicales carboxilo, halógeno, metoxilo y ácido sulfónico (Alcaraz et al., 2012; L.S. Clesceri, A.R. Greenberg, 2010) (Anexo I).

## 3.2.2 Oxidación hidrotermal con peróxido – Sistema de reacción

Un reactor de 43 mL en acero inoxidable 316, compuesto por un tubo de reacción de 3/4” de diámetro (externo) y 30.5 cm de largo, una válvula de aguja, un manómetro y acoples de alta presión HiP®, fue diseñado y construido para llevar a cabo las reacciones de oxidación hidrotermal con peróxido – OHP (Figura 3-2).



**Figura 3-2. Reactor de alta presión para reacciones de oxidación hidrotermal con peróxido.**

*El tubo de reacción consiste en un tubo de acero inoxidable 316, con un diámetro externo de 3/4” y una longitud de 30.5 cm (volumen de reacción de 43 mL). El tubo se sella en la parte inferior con una tapa ajustada. En la parte superior, el medidor de presión y la válvula de aguja se ajustan por medio de tubos de 1/4”. La presión máxima que soporta el reactor es 68 MPa a temperatura ambiente. Sin embargo, esta presión disminuye a medida que la temperatura se incrementa (HiP, n.d.).*

El horno del reactor (*Stanton Redcroft 1000c*) se precalentó a 500°C mientras los reactivos para la oxidación hidrotermal se cargaban según las proporciones descritas en el diseño experimental (entre 17-25 g de fase acuosa y 0-17 g de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% p/p) (Ver sección 3.2.3). El reactor se selló y se introdujo al horno. La temperatura del horno se controló por medio de un termopar, la del reactor por medio de una termocupla atada externamente y en contacto con las paredes del reactor, y la presión del sistema por medio del manómetro del reactor. Los tratamientos se realizaron a 350°C (164.3 bar, según condiciones de saturación del agua) y se mantuvieron a esta temperatura por tiempos diferentes, según el diseño de experimentos.

Al finalizar la reacción el reactor se dejó enfriar hasta temperatura ambiente por convección natural. El reactor se pesó y los gases generados durante la reacción se cuantificaron como la diferencia de peso una vez los gases se liberaron por medio de la válvula de aguja. Los productos líquidos de la reacción se pasaron por un papel filtro cualitativo (Whatman 1, 11 µm) para remover cualquier producto sólido u oleoso de la reacción, y las fases acuosas tratadas y filtradas se almacenaron a -5.0°C para análisis.

### 3.2.3 Diseño de experimentos y análisis estadístico

Un diseño factorial compuesto fue seleccionado debido al número de experimentos requeridos para desarrollar una superficie de respuesta. Puesto que el grado de tratamiento obtenido mediante oxidación hidrotermal con peróxido depende de las condiciones de reacción, se planteó el diseño con el fin de evaluar el efecto del tiempo de reacción,  $t$ , y de la relación molar de peróxido,  $\phi$ , sobre la calidad de las fases acuosas tratadas. La Figura 3-3 presenta el esquema típico de un diseño experimental compuesto de dos factores y dos niveles.

La relación molar de peróxido,  $\phi$ , se define como la cantidad de peróxido de hidrógeno en el reactor necesaria para eliminar la DQO de la fase acuosa, tomando el valor de uno cuando se alcanza la proporción estequiométrica. Se determina como:

$$\phi = \frac{C_{H_2O_2}}{DQO * 2.125} \quad (\text{Ecuación 3-10})$$

Donde,

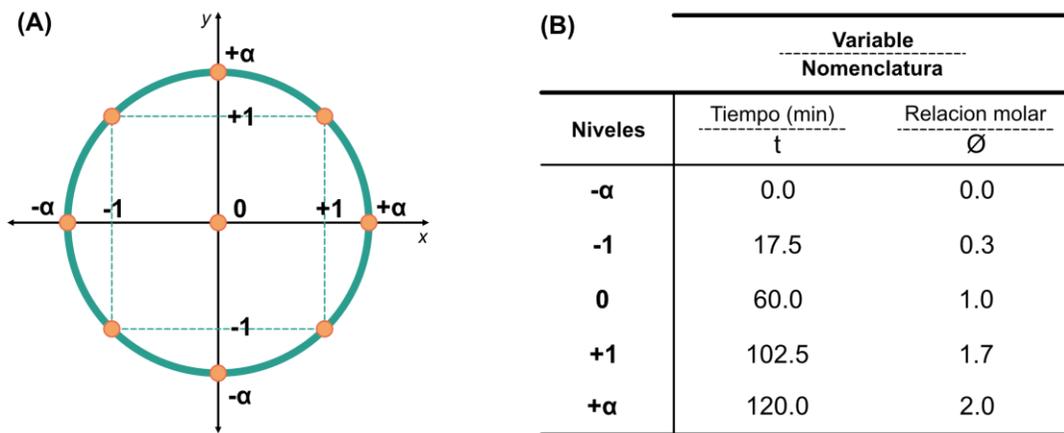
$C_{H_2O_2}$  = Concentración de  $H_2O_2$  en el reactor al momento de la reacción,  $mg L^{-1}$

DQO = Demanda química de oxígeno de la fase acuosa a tratar, en  $mg O_2 L^{-1}$

S = Factor estequiométrico, constante con valor de 2.125 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> **Nota:** 1 mg  $O_2/L$  de DQO, requiere de 2.125 mg de peróxido de hidrógeno, considerando que 1 mol de peróxido genera media mol de oxígeno según la reacción:  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Teniendo en cuenta lo anterior, en la Tabla 3-2 se resumen las condiciones de cada tratamiento planteado para la fase acuosa resultante de la licuefacción hidrotermal de microalgas. Las cantidades de fase acuosa ( $m_{FA}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $m_{H_2O_2}$ ) para cada caso se calcularon teniendo en cuenta la relación molar deseada y el agua necesaria para alcanzar la presión deseada a la temperatura de reacción ( $350^\circ C$ ). En total, nueve ensayos por duplicado se llevaron a cabo.



**Figura 3-3. Diseño factorial compuesto de dos factores con dos niveles.**

(A) Representación en el eje de coordenadas de las variables independientes X (tiempo de reacción) y Y (relación molar) y los puntos experimentales (en naranja) del diseño experimental propuesto.

(B) Tabla de valores para los niveles de cada variable del diseño experimental

Los datos experimentales se analizaron utilizando el paquete para generación de superficies de respuesta 'rsm' en el software *RStudio*® (*RStudio*, Boston USA) y se ajustaron a una ecuación polinomial de segundo orden. Las gráficas de las superficies de respuesta y curvas de nivel se obtuvieron en *Matlab*® (*MathWorks*, Natick, MA, USA) y el formato de las figuras se ajustó con *Affinity designer*® (*Serif Europe Ltd.*, Nottingham, UK). Se utilizó la siguiente función para lograr la interacción entre las variables dependientes e independientes:

$$Y = a + bX_1 + cX_2 + dX_1X_2 + eX_1^2 + fX_2^2 \quad (\text{Ecuación 3-11})$$

Donde Y es la variable de respuesta predicha,  $X_1$  y  $X_2$  son las variables independientes del experimento, a es un valor constante, y b-f son los coeficientes de interacción del modelo.

**Tabla 3-2. Condiciones de reacción para cada tratamiento planteado de la fase acuosa de la LHT**

Ensayo	T, °C	t, min	Ø	m <sub>Fa</sub> , g	m <sub>H2O2</sub> , g <sup>a</sup>
FA <sub>t1</sub>	350	102.5	1.7	18.33	8.74
FA <sub>t2</sub>	350	17.5	1.7	18.33	8.74
FA <sub>t3</sub>	350	102.5	0.3	23.63	1.48
FA <sub>t4</sub>	350	17.5	0.3	23.63	1.48
FA <sub>t5</sub>	350	120	1.0	20.98	5.11
FA <sub>t6</sub>	350	0	1.0	20.98	5.11
FA <sub>t7</sub>	350	60	2.0	17.24	10.24
FA <sub>t8</sub>	350	60	0.0	24.71	0.0
FA <sub>t9</sub> <sup>b</sup>	350	60	1.0	20.98	5.11

<sup>a</sup> Masa de peróxido de hidrógeno al 29.947% v/v

<sup>b</sup> Tratamiento realizado 5 veces (punto central del diseño)

Las variables de respuesta analizadas corresponden a los parámetros de calidad de agua medidos, tal como se explica en la sección 3.2.1.

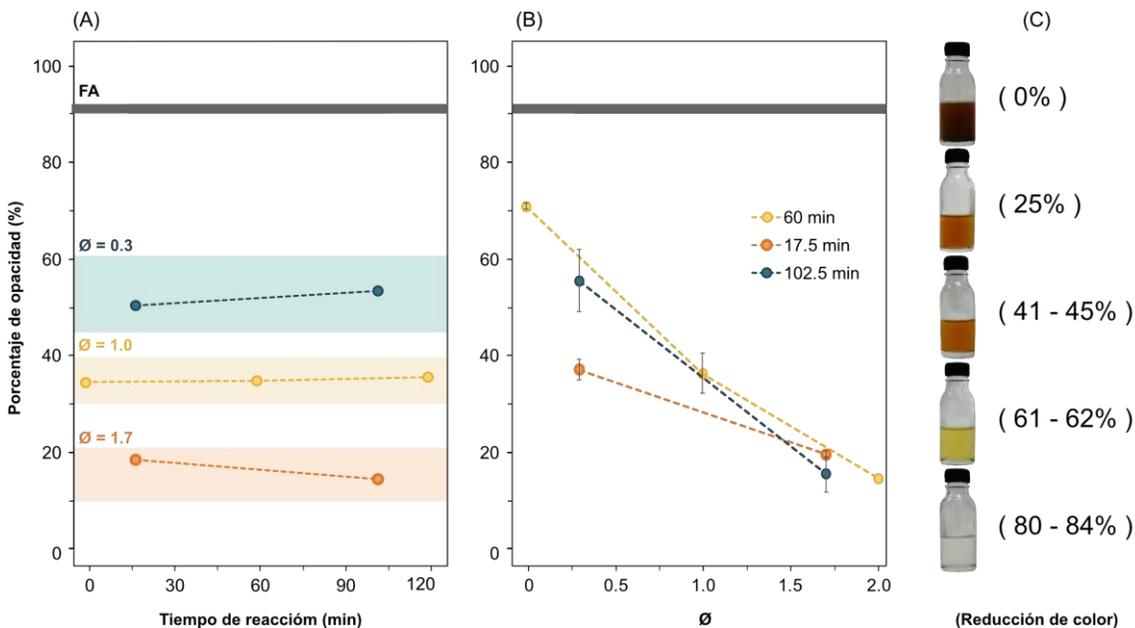
## 3.3 Resultados y análisis

### 3.3.1 Reducción de color

Los resultados para la intensidad del color de la fase acuosa durante el tratamiento hidrotermal con peróxido, según las diferentes condiciones del diseño experimental, se muestran en la Figura 3-4. La fase acuosa de la LHT de la microalga *C. vulgaris* presentaba un color marrón oscuro, debido principalmente al alto contenido de DQO y la presencia de moléculas de gran peso molecular que contienen nitrógeno, producto de reacciones de Maillard entre los azúcares, proteínas y aminoácidos de la biomasa (Alimoradi et al., 2020). Se encontró que la intensidad del color del agua tratada, para diferentes concentraciones

iniciales de peróxido durante la OHP a 350°C y 164 bar, es independiente del tiempo de reacción (Figura 3-4 A).

La reacción entre los radicales hidroxilos y las moléculas generadoras de color ocurre en etapas tempranas del proceso de oxidación hidrotermal, y se ve limitada por la concentración inicial de peróxido. Esto se puede apreciar en la figura, ya que la fase acuosa tratada todavía tiene presencia de color (marrón – amarillo) a relaciones molares de  $H_2O_2$  iguales o inferiores a la estequiométrica. Además, se puede afirmar que las reacciones de blanqueamiento ocurren incluso antes de alcanzar la temperatura y presión de reacción, ya que a una relación molar de peróxido de 1.0 y un tiempo de reacción de 0 min, se obtiene una remoción de color del 60%.



**Figura 3-4. Variación del color de la fase acuosa durante la oxidación hidrotermal con peróxido.**

La intensidad del color de las fases acuosas se representa como el porcentaje de opacidad de las muestras en una escala colorimétrica HSB, donde 0% corresponde al color blanco y 100% al color negro. Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas y las barras de error a la desviación estándar. (A) Efecto del tiempo de reacción sobre el color de la fase acuosa tratada, para diferentes relaciones molares de peróxido. Las bandas de color marcan grupos que son estadísticamente similares (ANOVA + Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). La franja gris representa el porcentaje de opacidad de la fase acuosa obtenida de la LHT de algas antes de ser tratada. (B) Efecto de la relación molar de peróxido sobre el color de la fase acuosa tratada, para diferentes tiempos de reacción. Todos son estadísticamente diferentes. (C) Fotografías de las fases acuosas obtenidas después del tratamiento y porcentajes de reducción del color, respecto a la opacidad de la fase acuosa sin tratamiento. Los rangos entre paréntesis corresponden a los porcentajes de reducción de color.

La reacción entre los radicales hidroxilos y las moléculas generadoras de color ocurre en etapas tempranas del proceso de oxidación hidrotermal, y se ve limitada por la concentración inicial de peróxido. Esto se puede apreciar en la figura, ya que la fase acuosa tratada todavía tiene presencia de color (marrón – amarillo) a relaciones molares de  $H_2O_2$  iguales o inferiores a la estequiométrica. Además, se puede afirmar que las reacciones de blanqueamiento ocurren incluso antes de alcanzar la temperatura y presión de reacción, ya que a una relación molar de peróxido de 1.0 y un tiempo de reacción de 0 min, se obtiene una remoción de color del 60%.

A estas condiciones de reacción, el reactor tardó 30 minutos en alcanzar la presión de operación (rampa de calentamiento de  $11^\circ C \text{ min}^{-1}$ ). Durante este tiempo, la mezcla reactiva estuvo sometida a las condiciones de reacción en que la WPO ocurre (Debellefontaine et al., 1996; Kolaczowski et al., 1999; Márquez et al., 2018); por lo que si se contempla que la fase acuosa de la LHT contiene iones metálicos disueltos, producto del lavado de la pared del reactor, la descomposición del peróxido ocurre rápidamente así como la oxidación de la materia orgánica. López Barreiro et al. (2015) reportaron presencia de Al, Mo, Fe, Ni y Zn en la fase acuosa de la LHT de microalgas (0.1 – 1.0 ppm) y Biller et al. (2012) concentraciones de Ni de hasta 3.8 ppm; concentraciones suficientes para iniciar la descomposición del peróxido y eliminar hasta en un 100% colorantes, como el rojo Congo, en tiempos de contacto inferiores a 20 minutos a  $100^\circ C$  (Kondru et al., 2009). Al aumentar la temperatura del reactor, el tiempo de contacto necesario para oxidar colorantes y descomponer en un totalidad el peróxido de hidrogeno puede ser llegar hasta los 2 – 6 minutos (Rueda-Márquez et al., 2015).

Al mismo tiempo, se encontró que, a tiempos de residencia constantes, la pérdida de color de la fase acuosa es proporcional al incremento de la relación molar de peróxido (Figura 3-4 B). El aumento de la concentración de oxidante genera una mayor producción de radicales oxidantes que reaccionan con los compuestos orgánicos relacionados con el color. Este efecto también fue observado por Pekakis et al. (2006) en el tratamiento de aguas residuales de industrias textiles. Por otra parte, nuevamente se aprecia que el tiempo de reacción no tiene un efecto considerable en la pérdida de color, pues los valores y tendencia de los datos coincide para cada tiempo de residencia estudiado.

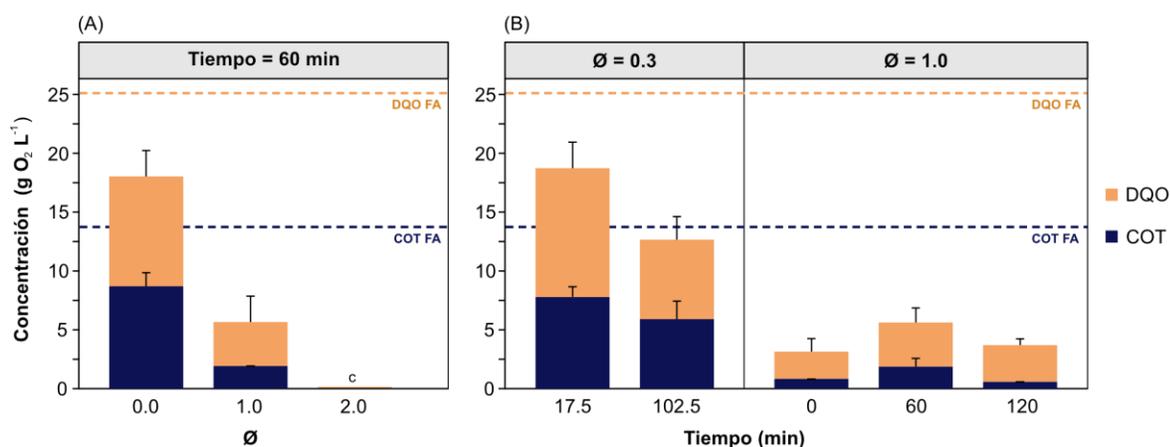
Cabe resaltar que con cuando la fase acuosa se sometió a condiciones de reacción por 60 minutos, sin peróxido ( $\emptyset = 0.0$ ), el color de esta se reduce en un 25%. Esto se debe a la presencia de oxígeno disuelto en la fase acuosa y al volumen de aire en el interior del reactor (atmósfera no inerte) que, a las condiciones subcríticas de reacción, forman una fase homogénea que permite la oxidación de algunos compuestos orgánicos presentes en el agua. En este caso, el oxígeno en el aire actúa como agente oxidante y los resultados son similares a los encontrados para la oxidación en agua supercrítica de aguas residuales con colorantes textiles, donde a 400°C, sin adición de peróxido y un tiempo de residencia de 0 minutos, se logran reducciones del 18% del color (Taylor et al., 2013).

La capacidad de eliminar color de la fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de microalgas es una característica importante para el tratamiento de esta, particularmente si se considera su uso para el crecimiento de microalgas. Al perder color, la fase acuosa permite una mejor penetración de la luz y por ende la actividad fotosintética y metabólica de las microalgas se ve favorecida.

### 3.3.2 Contenido de materia orgánica

La demanda química de oxígeno es un índice de la cantidad total de materia orgánica presente en el agua, particularmente de aquella que es susceptible de ser oxidada. Este parámetro es uno de los principales indicadores de la calidad general de los efluentes acuosos, ya que de forma rápida permite establecer la efectividad de los métodos de tratamiento para la remoción de carga orgánica contaminante. A pesar de que la DQO permite obtener un estimativo del carbono presente en la muestra, este elemento de la materia orgánica no es el único susceptible de ser oxidado. Por este motivo, la medida del carbono orgánico total resulta más conveniente. Como se observa en la Figura 3-5, la demanda química de oxígeno y el contenido de carbono orgánico del agua tratada varió entre 0 – 12.5 g O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> y 0 – 4.1 mg C L<sup>-1</sup>, respectivamente, al ser tratada bajo cada una de las condiciones establecidas por el diseño experimental. En general, para todos los tiempos de reacción y las relaciones molares de peróxido estudiados, se tiene una reducción de por lo menos el 40 % de la DQO y del COT de la fase acuosa original.

Para un tiempo de residencia de 60 minutos, se aprecia una reducción proporcional de los dos parámetros a medida que aumenta la relación molar de peróxido empleada en la reacción de oxidación. Por una parte, se aprecia que bajo condiciones no oxidantes ( $\emptyset = 0.0$ ) el contenido de materia orgánica oxidable y de carbono orgánico se reducen en un 50 y 37% respectivamente. Por otra, en condiciones de exceso de oxidante ( $\emptyset = 2.0$ ), la fase acuosa resultante no presenta DQO ni COT. Este resultado, de forma análoga a lo que sucedía con el color de la fase acuosa, se debe a la mayor disponibilidad de iones  $\cdot\text{OH}$  que oxidan la materia orgánica. La reducción de COT en ausencia de oxidante se asemeja a los resultados encontrados para la SCWO de agua residual de una planta productora de aceite de oliva (Erkonak et al., 2008) y de lodos activados (Qian et al., 2015).



**Figura 3-5. Efecto del tiempo de reacción y la relación molar de peróxido ( $\emptyset$ ) sobre la concentración de materia orgánica oxidable y carbono orgánico en la fase acuosa de la LHT de microalgas.**

La demanda química de oxígeno se expresa como  $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ . El carbono orgánico total se expresa en las mismas unidades, y se obtiene al multiplicar el COT,  $\text{mg L}^{-1}$ , por el factor estequiométrico (32/12).

(A) Efecto de la relación molar de peróxido para un tiempo de reacción de 60 minutos.

(B) Efecto del tiempo de reacción para diferentes relaciones molares de peróxido.

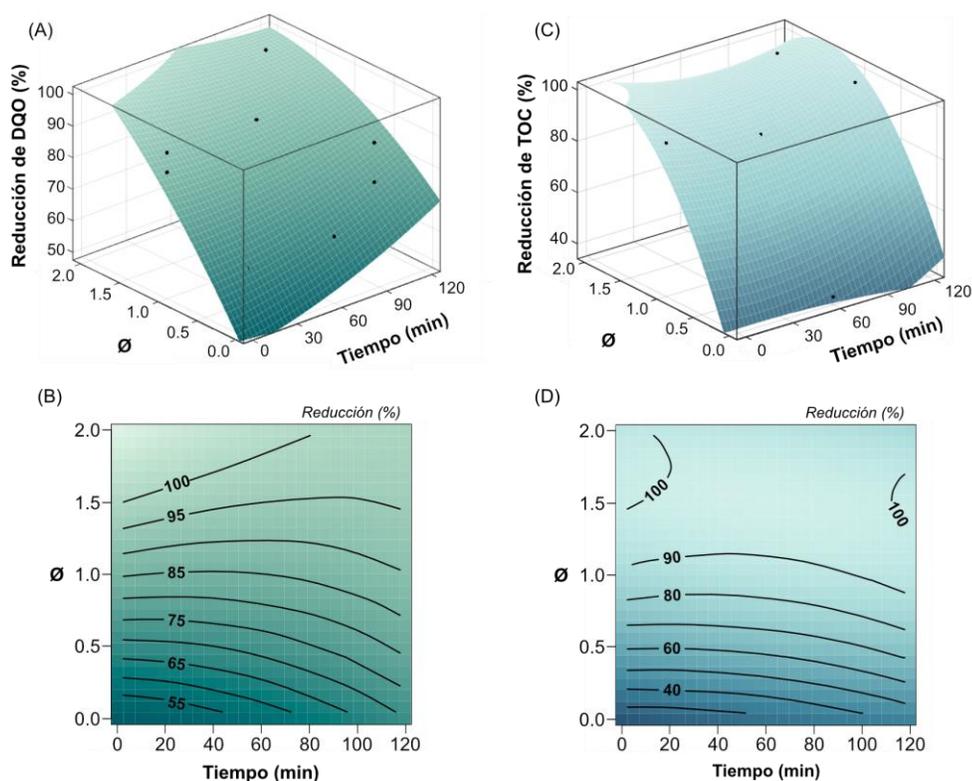
Las líneas discontinuas representan la DQO y el COT de la fase acuosa previa a los tratamientos. Los datos corresponden a valores promedio  $\pm$  DE ( $n = 3$ ).

DQO = demanda química de oxígeno, COT = carbono orgánico total, FA = fase acuosa

A pesar de que no se muestran los resultados, la fase acuosa tampoco presentó DQO ni COT cuando se trató a una relación molar de peróxido de 1.7, independientemente del tiempo de reacción. Este resultado sugiere que hay un punto por encima de la relación estequiométrica, a partir del cual, mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno no mejoran la calidad del agua, en términos de materia orgánica. Igualmente, el exceso de

oxidante, entre las relaciones estequiométricas estudiadas, tampoco deteriora la remoción de carbono de la fase acuosa.

Según Benatti et al. (2006), la disponibilidad de radicales  $\cdot\text{OH}$  en exceso favorece reacciones secundarias, en las cuales estos mismos reaccionan con el peróxido de hidrógeno para producir radicales perhidroxilo ( $\text{HO}_2\cdot$ ). Estos radicales además de poseer un menor poder oxidante, consumen los radicales hidroxilos necesarios para la oxidación hidrotermal, por lo que desfavorece la remoción de materia orgánica. En este orden de ideas, resulta importante optimizar la relación molar de peróxido de hidrógeno, considerando factores tanto económicos como medioambientales (véase (Ecuación 3-23)).



**Figura 3-6. Remoción de materia orgánica y de carbono durante la oxidación hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de microalgas.**

(A-B) Superficie de respuesta y curva de nivel para la remoción de DQO.  $\text{DQO}_{\text{inicial}} = 25,000 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ .

(C-D) Superficie de respuesta y curva de nivel para la remoción de COT.  $\text{COT}_{\text{inicial}} = 5,202 \pm 65 \text{ ppm}$ .

Cuando se analiza el efecto del tiempo de reacción sobre la descomposición de materia orgánica, se tiene que en medios poco oxidantes ( $\text{Ø} = 0.3$ ) la DQO y el COT de la fase

acuosa tratada disminuyen a mayor tiempo de residencia dentro del reactor. En medios más oxidantes, el efecto del tiempo de reacción sobre la calidad de la fase acuosa resultante no es significativo. Cuando la concentración de peróxido en el reactor es baja, los radicales hidroxilo producidos a partir de este son consumidos completamente en etapas tempranas del proceso de oxidación hidrotermal (a tiempos de residencia de 0 minutos ya existe remoción de DQO y COT), por lo que la reducción de carbono y materia orgánica a mayores tiempos de residencia se debe a reacciones de despolimerización y descarboxilación por acción del agua supercrítica (Savage, 1999).

En la Figura 3-6 se puede apreciar el efecto combinado del tiempo de residencia y la relación molar de peróxido, sobre la remoción de DQO y COT, por medio de las superficies de respuesta y las curvas de nivel obtenidas para cada caso. El valor de ajuste de las superficies a los datos experimentales ( $R^2$ ) para los dos casos es prácticamente el mismo ((Ecuación 3-12 y (Ecuación 3-13).

El  $R^2$  obtenido para la remoción de DQO y COT, significa que el 65 – 66% de la variación de los datos puede ser representada por el modelo ajustado. Se encontró que, al realizar la oxidación hidrotermal con peróxido a 350°C, con tiempos de residencia entre 0 – 120 min y relaciones molares de peróxido entre 0.0 – 2.0, la remoción de DQO y COT osciló entre 50 – 100% y 30 – 100%, respectivamente. Las ecuaciones para cada modelo ajustado, recalculado a partir de la primera regresión obtenida y empleando aquellos coeficientes que son significativos (test ANOVA,  $p < 0,05$ ), se presentan a continuación:

$$\text{DQO [mg O}_2\text{ L}^{-1}] = 3947.11 - 3788.68 \left( \frac{\phi - 1}{0.7} \right) \quad R^2 \text{ adj.} = 0.6494 \quad (\text{Ecuación 3-12})$$

$$\text{COT [mg L}^{-1}] = 3380.31 - 3779.34 \left( \frac{\phi - 1}{0.7} \right) + 727.06 \left( \frac{\phi - 1}{0.7} \right)^2 \quad R^2 \text{ adj.} = 0.6504 \quad (\text{Ecuación 3-13})$$

En general, se aprecia nuevamente que el tiempo de residencia no es significativo sobre la remoción de materia orgánica y carbono del agua residual; y que la dependencia de la relación molar de peróxido sigue una ecuación de primer orden para la DQO y de segundo orden para el COT. Para el caso de la superficie de respuesta de reducción del carbono orgánico total, se tiene un punto de silla a  $t = 66.6$  min y  $\phi = 1.66$ , en el cual la remoción

es máxima respecto a la relación molar de peróxido, pero mínima respecto al tiempo de residencia de la reacción.

La fase acuosa proveniente de la LHT de microalgas está constituida por sulfuros, cloruros, fenoles y otros hidrocarburos, para los cuales la DQO no ofrece un valor adecuado de los requerimientos verdaderos de oxígeno para oxidar toda la materia orgánica, ya que no son oxidables (como el amonio) o son resistentes a la oxidación (compuestos aromáticos) por el dicromato empleado para la cuantificación de este indicador (Papadopoulos et al., 2007). Por este motivo, a pesar de que la relación molar estequiométrica ( $\emptyset = 1.0$ ) fue estudiada y calculada respecto a la DQO de la fase acuosa sin tratar, solo reducciones alrededor del 85% fueron obtenidas.

En comparación con otros métodos de oxidación que emplean peróxido como agente oxidante, se ratificó que las condiciones de estudio del presente trabajo se encuentran en medio de aquellas empleadas por la WPO y la SCWO. Por una parte, al tratar efluentes de refinerías por medio de una oxidación en medio húmedo con peróxido, se encontró que, para concentraciones iniciales de peróxido similares a las tratadas en este trabajo (35 y 175 mg L<sup>-1</sup>), al cabo de 20 minutos de contacto, se tiene una reducción de COT entre el 20 y el 80% (Rueda-Marquez et al., 2016). Al final, los autores concluyen que mayores rendimientos pueden ser obtenidos si se incrementa el tiempo de contacto entre el peróxido y el agua residual o si se incrementa la temperatura de reacción. Por otro lado, en condiciones supercríticas, Li et. al (2020), demostraron que a 600°C y empleando una relación estequiométrica de peróxido, tan solo 3 minutos de reacción son necesarios para remover más del 99.5% de la DQO de lodos de campos petroquímicos.

Estos resultados permiten inferir que, si el objetivo es optimizar la reducción de DQO y COT presente en el agua residual, bajos tiempos de residencia son necesarios y un leve exceso de peróxido de hidrógeno es requerido. A pesar de que tiempos de residencia prolongados y relaciones molares de peróxido elevadas permitan una remoción completa de materia orgánica, los costos económicos no compensan la mejora obtenida en la calidad del agua dado el uso que se le pretende dar a esta. Se encuentra que con un tiempo de residencia de 0 minutos a 350°C y una relación molar de peróxido de hidrógeno de 1.5, la totalidad de la materia orgánica y del carbono orgánico de la muestra son eliminados de la fase acuosa. Cabe anotar, que sin embargo, el uso de altas concentraciones de peróxido

en este tipo de procesos deben ser tratado con cautela, debido a la corrosividad que este reactivo tiene para los materiales de construcción del reactor (Kritzer, 2004).

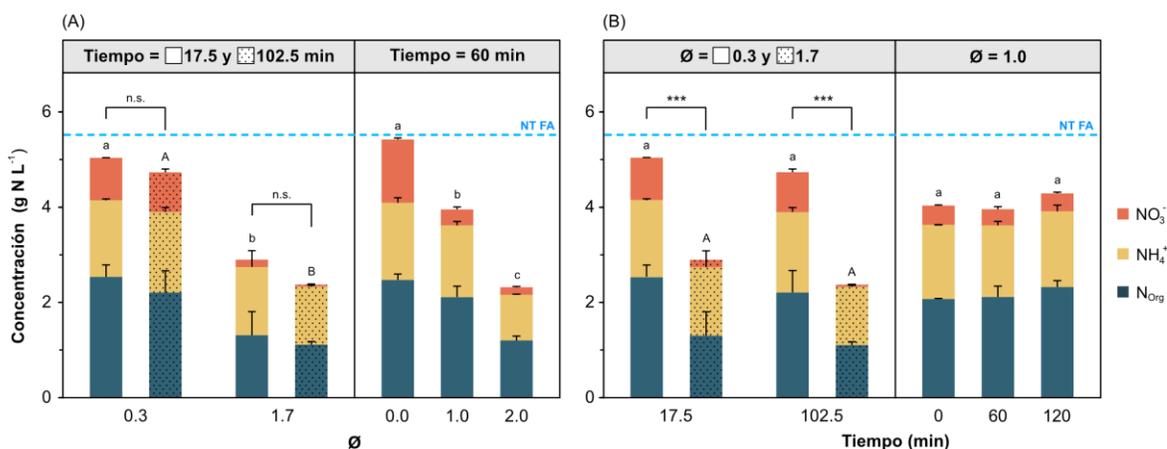
Por el contrario, si el objetivo es cumplir con los límites de descarga para aguas residuales o recuperar carbono por medio de la recirculación de la fase acuosa tratada para la producción de biomasa, se debe optar por relaciones molares de peróxido cercanas al valor estequiométrico. Esto se debe a que durante las reacciones de oxidación por radicales HO·, la mayoría de los compuestos carbonáceos primero se oxida a ácidos carboxílicos y alcoholes, para luego ser mineralizados como CO<sub>2</sub> (Debellefontaine et al., 1996). Estos compuestos orgánicos de bajo peso molecular son menos contaminantes y además, pueden ser tomados por microalgas como fuente de energía y/o carbono, en condiciones de cultivo mixotróficas (Laliberté & De La Noüe, 1993; Tan et al., 2020).

### 3.3.3 Especies de nitrógeno

Durante la licuefacción hidrotermal de microalgas, la gran mayoría del nitrógeno se concentra en la fase acuosa principalmente como amonio, el cual puede ser asimilado por las microalgas como fuente de nitrógeno y que por lo tanto puede ser recirculado. Por este motivo, se pretende que el tratamiento hidrotermal de la fase acuosa resultante de la LHT sea efectivo para remover contaminantes orgánicos y compuestos tóxicos, mientras que nutrientes como nitrógeno o fósforo permanezcan en el agua tratada para ser recirculados y valorizados, cerrando el ciclo de tratamiento. Se evaluó el efecto del tiempo de reacción y de la relación molar de peróxido sobre el contenido de nitrógeno total (NT), amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) de la fase acuosa tratada y los resultados encontrados se resumen en la Figura 3-7.

En el agua resultante del tratamiento de oxidación, el nitrógeno se puede presentar en tres formas solubles: amonio, nitrato y nitrógeno orgánico; por lo que a partir del contenido de nitrógeno total medido para cada tratamiento se determinó el nitrógeno orgánico (N<sub>org</sub>) por diferencia. La diferencia entre el NT de la fase acuosa sin tratar y cada una de las aguas obtenidas después de los tratamientos corresponde a la pérdida de nitrógeno como nitrógeno gaseoso (N<sub>2(g)</sub>) y en menor medida óxidos de nitrógeno (Killilea et al., 1992). En general, se puede apreciar una reducción de entre 5 y 60% del nitrógeno total de la fase

acuosa de la LHT, que se pierde como  $N_{2(g)}$ . El menor porcentaje de pérdida se da a bajas relaciones molares de peróxido, mientras que, por el contrario, la mayor pérdida ocurre cuando la relación molar es 2.0. Se observa igualmente que el tiempo de residencia de la reacción no tiene un efecto significativo sobre el NT resultante en las aguas tratadas.



**Figura 3-7. Efecto del tiempo de reacción y la relación molar de peróxido sobre la concentración de las especies de nitrógeno presentes en la fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de microalgas.**

(A) Efecto de la relación molar de peróxido para diferentes tiempos de reacción.

(B) Efecto del tiempo de reacción para diferentes relaciones molares de peróxido.

Los datos corresponden a valores promedio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Las letras minúsculas y mayúsculas señalan grupos de datos obtenidos a las mismas condiciones según se señala en las cajas grises. Las barras que comparten letras (minúsculas/mayúsculas) no son significativamente diferentes (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). La línea discontinua representa el nitrógeno total de la fase acuosa previa a los tratamientos. Las líneas sobre las barras señalan las diferencias significativas entre grupos (Test ANOVA + Tukey HSD,  $*** p < 0.001$ ).

$NO_3^-$  = nitrato,  $NH_4^+$  = amonio,  $N_{org}$  = nitrógeno orgánico.  $N_{org} = \text{Nitrógeno total (NT)} - NO_3^- - NH_4^+$ .

Al analizar el efecto de la relación molar de peróxido (Figura 3-7 A), se encuentra que, para tiempos de reacción constante, la concentración de nitrógeno total en las fases acuosas tratadas es menor cuanto mayor es la concentración de peróxido. El mayor aporte a la reducción de TN, sin embargo, se debe mayoritariamente a la reducción del contenido de nitratos y nitrógeno orgánico. En ausencia de peróxido, la reducción de cada una de las especies de nitrógeno es imperceptible, por lo que se concluye es necesaria la adición del agente oxidante o un incremento de la temperatura de reacción para la remoción de estos contaminantes. Esta última afirmación se soporta en los resultados obtenidos en diferentes estudios de SCWO donde, en ausencia de oxidantes, a temperaturas superiores a los

500°C se obtienen reducciones del contenido de NT de hasta el 100% (Al-duri & Alsoqyani, 2017; García-jarana et al., 2013; B. Yang, Cheng, Tang, et al., 2018).

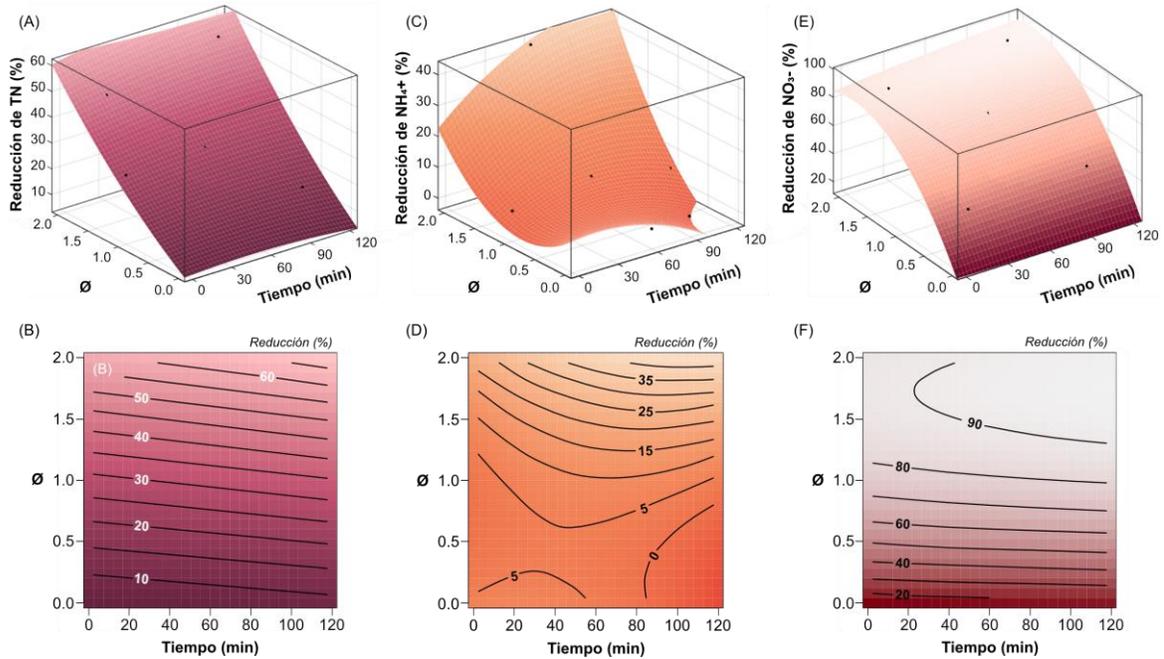
En cuanto al tiempo de reacción, nuevamente se encuentra que el efecto de este no es significativo para los rangos estudiados, pues las reacciones de oxidación y desnitrificación de los compuestos nitrogenados ocurren en etapas tempranas del tratamiento hidrotermal (Al-duri & Alsoqyani, 2017). Este fenómeno ocurre debido a la forma en que se llevó a cabo la reacción. Los reactivos se cargaron al reactor a temperatura ambiente y gradualmente se calentaron junto con este hasta alcanzar la temperatura de reacción (350°C), momento a partir del cual se define que el tiempo de residencia es de 0 minutos. Durante la rampa de calentamiento el peróxido de hidrógeno se descompone y descompone la materia orgánica. Para evitar estos problemas, una solución plausible es presurizar y calentar los reactantes por separado, empleando bombas de alta presión, para luego ser mezclados en el tubo de reacción y llevar a cabo la oxidación hidrotermal. Este método es el que ha sido empleado para estudiar la oxidación en agua supercrítica por diversos autores (Matsumura et al., 2005), sin embargo, hay un incremento en los costos relacionados con los equipos e instrumentos necesarios para esta metodología.

Las superficies de respuesta y diagramas de contorno obtenidos, al considerar el efecto del tiempo de reacción y la relación molar de peróxido, demuestran nuevamente que la reducción de nitrógeno total en la fase acuosa es resultado de la desnitrificación del nitrato y la oxidación del nitrógeno presente en la materia orgánica. Los mecanismo de formación de amonio y nitrato a partir de nitrógeno orgánico son complejos, y son descritos en detalle por Li et al. (2020); mientras que el mecanismo de desnitrificación del nitrato se resume en las siguientes ecuaciones.



Para estos casos, los coeficientes de ajuste obtenidos siguen el orden  $R^2_{\text{NO}_3} > R^2_{\text{TN}} > R^2_{\text{NH}_4}$  y representan el 97, 92 y 72% de los datos encontrados experimentalmente. Se aprecia que, para los rangos de estudio, hay una disminución entre el 10 y 60% del nitrógeno total,

representado en un 0 – 27% por la desnitrificación de nitrato, 0 – 13% por la oxidación de amonio y un 10 – 20% por la oxidación de materia orgánica.



**Figura 3-8. Remoción de nitrógeno total y sus especies durante la oxidación hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de microalgas.**

(A-B) Superficie de respuesta y curva de nivel para la remoción de NT.  $NT_{inicial} = 5,768.7 \text{ ppm N}$ .

(C-D) Superficie de respuesta y curva de nivel para la remoción de  $NH_4^+$ .  $NH_4^+_{inicial} = 1,662 \text{ ppm } NH_4^+-N$ .

(E-F) Superficie de respuesta y curva de nivel para la remoción de  $NO_3^-$ .  $NO_3^-_{inicial} = 1,579,3 \text{ ppm } NO_3^- -N$ .

A continuación, se presentan las ecuaciones para cada modelo, que al igual a lo realizado anteriormente para la materia orgánica, se recalcularon y ajustaron con los coeficientes significativos:

$$NT \text{ [mg N L}^{-1}\text{]} = 3865.43 - 1090.49 \left( \frac{\emptyset - 1}{0.7} \right) \quad R^2 \text{ adj} = 0.9266 \quad (\text{Ecuación 3-16})$$

$$NH_4^+ \text{ [mg N L}^{-1}\text{]} = 1555.22 - 197.62 \left( \frac{\emptyset - 1}{0.7} \right) - 108.69 \left( \frac{\emptyset - 1}{0.7} \right)^2 \quad R^2 \text{ adj} = 0.6930 \quad (\text{Ecuación 3-17})$$

$$NO_3^- \text{ [mg N L}^{-1}\text{]} = 340.73 - 30.07 \left( \frac{\emptyset - 1}{0.7} \right) - 3933907 \left( \frac{t - 60}{42.5} \right) + 177.68 \left( \frac{\emptyset - 1}{0.7} \right)^2 \quad R^2 \text{ adj} = 0.9775 \quad (\text{Ecuación 3-18})$$

Todos los modelos son fuertemente influenciados por la relación molar de peróxido; sin embargo, el modelo ajustado para la concentración de amonio arroja un ajuste cuadrático que resulta en un punto de silla ( $t = 38.5$  min,  $\emptyset = 0.4$ ). Adicionalmente, el modelo ajustado para la remoción de nitrato es el único que estadísticamente resulta depender del tiempo de reacción. Este modelo permite calcular un máximo local de remoción de nitratos a una relación molar de peróxido de 1.85 por un tiempo de residencia más prolongado (300 min). Este dato resulta de gran utilidad si el objetivo del tratamiento es la remoción completa del nitrato presente en el agua residual.

Aunque resulte contradictorio que en medios oxidantes la reducción de nitratos sea casi total, en comparación con la reducción de amonio (90% y 35%, respectivamente, para tratamientos durante 60 minutos y  $\emptyset = 2.0$ ), este resultado se puede justificar por la producción de amonio como resultado de la oxidación de materia orgánica y el rol oxidante de los nitratos a condiciones críticas (véase (Ecuación 3-19). En condiciones cercanas o superiores al punto crítico del agua, se ha reportado que nitrato y amonio son los principales productos obtenidos al oxidar materia orgánica que contiene nitrógeno. En promedio, alrededor del 40% del nitrógeno resulta en amonio, mientras que tan solo 10% resulta en nitrato (B. Yang, Cheng, Tang, et al., 2018).

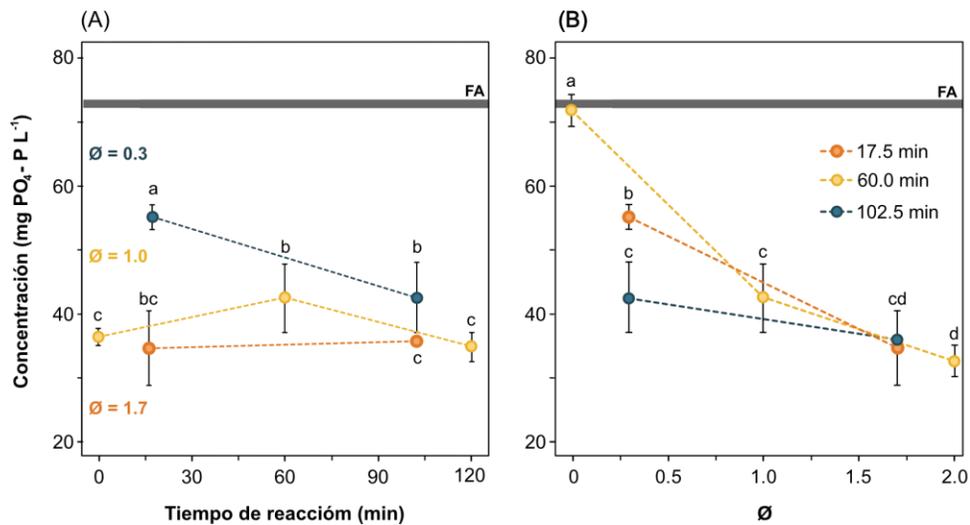
Este resultado implicaría que el contenido de amonio en la fase acuosa tratada incrementaría a medida que la materia orgánica es degradada. Sin embargo, se tiene que en condiciones críticas, el mecanismo de remoción de nitrato no es por acción de radicales hidroxilo sino por reacción directa con iones amonio (Ecuación 3-19); por lo que el amonio recién formado es reducido por el nitrato presente en la fase acuosa, y ocurre la desnitrificación de los dos (Qian et al., 2015; B. Yang, Cheng, Yuan, et al., 2018).



Al analizar en conjunto las superficies de respuesta, se busca maximizar la disminución de nitrógeno orgánico mientras la reducción de amonio y nitrato es mínima. Esto se debe a que las moléculas orgánicas con nitrógeno presentes en el agua de la LHT de algas, en su gran mayoría resultan tóxicas para estas o inhiben su crecimiento (NIVA, 2008), mientras que, el amonio y el nitrato pueden ser consumido por estas como fuente de nitrógeno (Lachmann & Spijkerman, 2019; Luz et al., 2002; Sanz-luque et al., 2015).

### 3.3.4 Fósforo soluble

Al igual que pasa con el nitrógeno, el fósforo es otro elemento importante para el desarrollo de las microalgas y por ende para la producción de biomasa (Wymer & Thake, 1980). En ese sentido, la reducción de su concentración en la fase acuosa de LHT debe ser mínima para mejorar la recuperación de este elemento por medio de la reutilización del agua residual. Para las condiciones de reacción estudiadas se encontró que, a bajas relaciones molares de peróxido, hay mayor reducción en la concentración de fósforo a mayores tiempos de residencia. Por el contrario, cuando la relación molar se corresponde con el valor estequiométrico o hay un exceso de oxidante, el efecto del tiempo de reacción no es significativo. Por otro lado, a tiempos de residencia constantes, la concentración de fósforo en el agua tratada disminuye a medida que la concentración inicial de peróxido en el reactor es mayor (Figura 3-9).



**Figura 3-9. Efecto del tiempo de reacción y la relación molar de peróxido sobre la concentración de fosfato en la fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de microalgas.**

(A) Efecto de la relación molar de peróxido para diferentes tiempos de reacción.

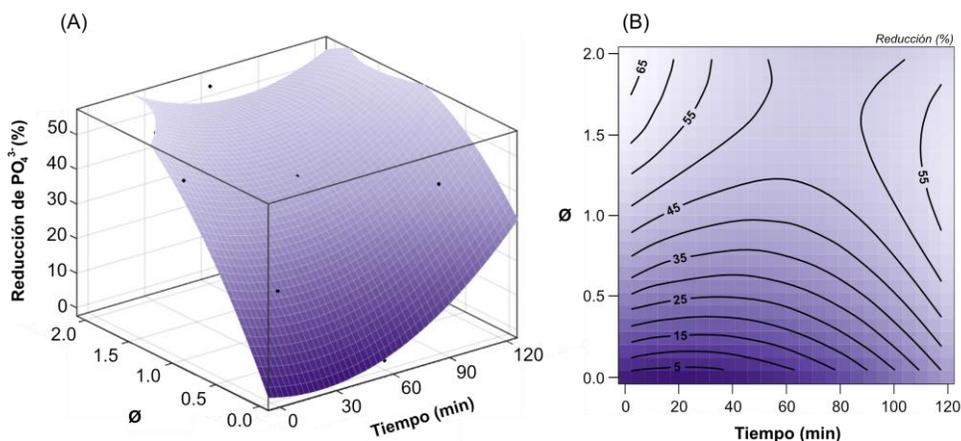
(B) Efecto del tiempo de reacción para diferentes relaciones molares de peróxido.

Los datos corresponden a valores promedio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Los puntos que comparten letras no son significativamente diferentes (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). La línea gris representa el nitrógeno total de la fase acuosa previa a los tratamientos.  $\text{PO}_4^{3-}$  = fosfato.

A partir de la Figura 3-9 (B), se puede inferir que, la presencia de agente oxidante es necesaria para que exista una reducción en la concentración de fosfatos presentes en el agua residual. En condiciones cercanas al punto crítico del agua, el peróxido de hidrógeno da lugar a la formación de radicales hidroxilo que oxidan el fósforo ligado a materia orgánica en fosfatos, los cuales son posteriormente oxidados para formar pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ). Este último, precipita como sólido y puede ser recuperados al final de la reacción (Stendahl, 2018).

En ese orden de ideas, tiene sentido que a mayor concentración de peróxido las reacciones secundarias de oxidación de fósforo a  $P_2O_5$  se vieran favorecidas y la concentración de fosfatos solubles en el agua residual disminuyera. A bajas concentraciones de peróxido, el mismo efecto se logra al dejar la mezcla reactivo a las condiciones de reacción por tiempos más prolongados. En este caso no solo se propicia la formación del pentóxido, sino también el ligamiento de iones metálicos a iones fosfato, provocando su precipitación (Stark et al., 2006; Stendahl, 2018).

Desafortunadamente, no se pudo cuantificar la cantidad de óxidos de fósforo precipitados al momento de filtrar las fases acuosas tratadas, ya que la baja concentración inicial de fosfato y la cantidad de fase acuosa de la LHT empleada para cada punto experimental, no permitieron su cuantificación por gravimetría.



**Figura 3-10. Remoción de fosfato durante la oxidación hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de microalgas.**

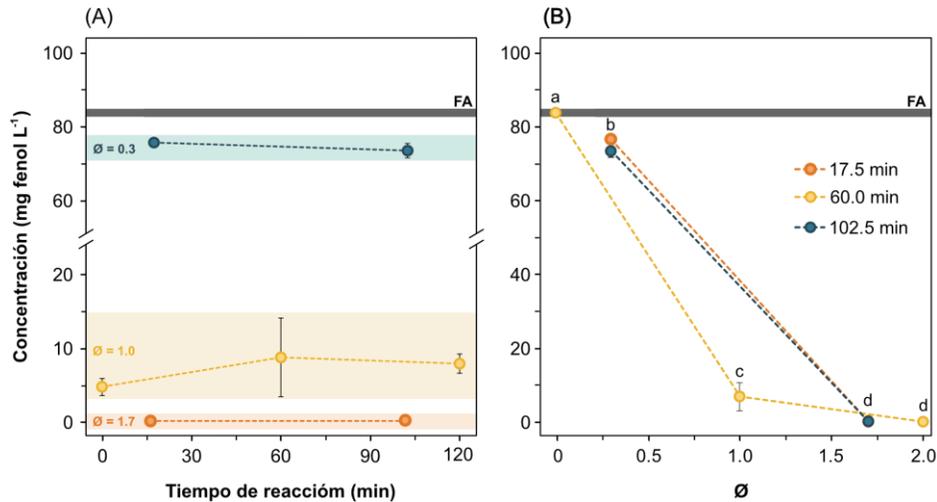
(A-B) Superficie de respuesta y curva de nivel para la remoción de  $PO_4^{3-}$ .  $PO_4^{3-}$  inicial = 72 ppm P.

La superficie de respuesta para la reducción de fosfato (Figura 3-10) representa tan solo el 40% de variabilidad de los datos, siendo el modelo con menor ajuste estadístico. Igualmente, presenta un punto de silla ( $t = 71.6$  min,  $\emptyset = 1.7$ ) y sigue una ecuación de primer orden respecto a la relación molar de peróxido.

$$PO_4^{3-} \text{ [mg P L}^{-1}\text{]} = 42.3734 - 9.7055 \left( \frac{\emptyset - 1}{0.7} \right) \quad R^2 \text{ adj} = 0.3349 \quad (\text{Ecuación 3-20})$$

### 3.3.5 Compuestos fenólicos

Quizás la remoción de fenoles y otros compuestos cíclicos aromáticos ha sido uno de los temas más estudiados en cuanto a la aplicación de procesos avanzados de oxidación para el tratamiento de aguas residuales (Erkonak et al., 2008; Gopalan & Savage, 1995; Portela et al., 2001; Qian et al., 2015; H. Zhang et al., 2020). La cantidad y variedad de estudios al respecto de la remoción de estos contaminantes se deben a su gran reactividad química, sus efectos severos y prolongados sobre el medio ambiente; además de la toxicidad que presentan para los humanos y los organismos acuáticos que habitan en cuerpos de agua donde efluentes que contienen este tipo de moléculas son descargados (Anku et al., 2017).



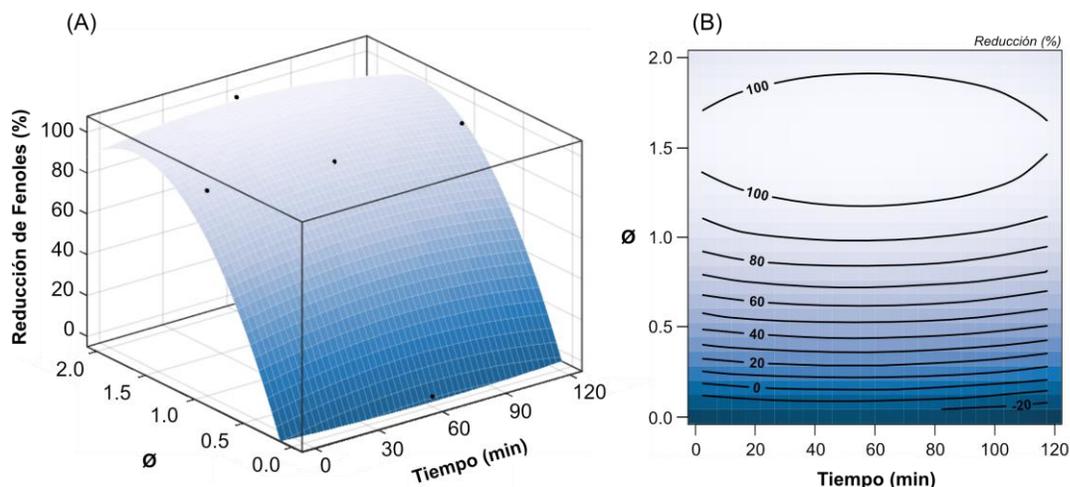
**Figura 3-11. Efecto del tiempo de reacción y la relación molar de peróxido sobre la concentración de fenoles en la fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de microalgas.**

(A) Efecto de la relación molar de peróxido para diferentes tiempos de reacción.

(B) Efecto del tiempo de reacción para diferentes relaciones molares de peróxido.

*Los datos corresponden a valores promedio  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Los puntos que comparten letras no son significativamente diferentes (Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). La línea gris es el fenol en la FA sin tratar.*

En términos del tiempo de residencia de la reacción, se tiene que la degradación de compuestos fenólicos a ácidos orgánicos ocurre en etapas tempranas del proceso oxidativo, cuando la concentración de radicales HO $\cdot$  es máxima. Así lo demuestran Munoz et. al (2013), quienes estudiaron el efecto de la temperatura de reacción y el tiempo de residencia en la degradación de clorofenoles empleando una oxidación con peróxido por vía húmeda. Se encontró, que a una relación estequiométrica de 1.0, el tiempo necesario para degradar estos compuestos hasta valores constantes, pasaba de 240 min a 30 min, cuando la temperatura de reacción incrementaba desde 50°C hasta 90°C. Estos resultados sugieren que la degradación de compuestos fenólicos a temperaturas cercanas al punto crítico del agua, ocurre en cuestión de segundos, de forma similar a los resultados encontrados en procesos de SCWO (G. Lee et al., 2002; Martino & Savage, 1997).



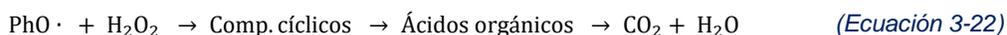
**Figura 3-12. Remoción de fenoles durante la oxidación hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de microalgas.**

*(A-B) Superficie de respuesta y curva de nivel para la remoción de fenoles. Fenol<sub>inicial</sub> = 83.9 ppm.*

Respecto a la relación molar de peróxido, se tiene que el incremento en la reducción de fenoles no es lineal respecto al incremento en la concentración inicial de peróxido (Figura 3-12). Este resultado valida lo encontrado por Zhang et al. (2020) para la oxidación hidrotermal con peróxido de fenol a 400°C. Por una parte, en ausencia de peróxido y un tiempo de reacción de 15 minutos, no hubo remoción de fenol; por otra, al incrementar la

concentración de oxidante hasta el valor estequiométrico, la reducción se produjo en un 72%.

Sin embargo, el presente estudio demuestra que al incrementar aún más la concentración de peróxido se tiene un máximo local de remoción de fenol a una relación molar de 1.57. en función del grado de oxidación, la degradación de fenol puede dar lugar a otros compuestos cíclicos (como el catecol y la hidroquinona), ácidos orgánicos o incluso CO<sub>2</sub> (tal como se muestra en las ecuaciones (Ecuación 3-21 y (Ecuación 3-22) (Alnaizy & Akgerman, 2000; Luis et al., 2009)



Al incrementar la relación molar de peróxido hasta tener un exceso del 100%, el exceso de radicales HO· propicia el desarrollo de reacciones secundarias que disminuyen la oxidación de materia orgánica y, por ende, la oxidación de compuestos fenólicos (Ecuación 3-23).



La ecuación para el modelo ajustado se presenta a continuación:

$$\text{Fenoles [ ppm fenol]} = 10.234 - 33.839 \left( \frac{\emptyset - 1}{0.7} \right) + 19.829 \left( \frac{\emptyset - 1}{0.7} \right)^2 \quad R^2 \text{ adj} = 0.9343 \quad (\text{Ecuación 3-24})$$

### 3.3.6 Optimización de variables

El diseño experimental planteado permite que las superficies de respuesta sean optimizadas, estableciendo funciones objetivo para que sean alcanzadas por medio de la variación de las variables independientes (Myers & Montgomery, 1997). En el presente estudio se busca optimizar la remoción de materia orgánica (DQO, TOC, N<sub>org</sub>) así como de fenoles, mientras la remoción de nutrientes esenciales y/o asimilables por las microalgas

es mínima (nitrato, amonio y fosfato). Los costos involucrados en el tratamiento hidrotermal no se contemplan para realizar la optimización de variables. La optimización se llevó a cabo por medio del optimizador de superficies de respuesta del software Minitab®. Las condiciones óptimas de tratamiento, así como la concentración y remoción esperada de cada componente en la fase acuosa tratada se presentan en la Tabla 3-3.

**Tabla 3-3. Condiciones de operación óptimas para el tratamiento hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.**

Variables óptimas	Tiempo	39.01 min	Relación molar de peróxido	1.035	Factor de deseabilidad compuesto <sup>a</sup>			0.5449
Parámetros de calidad	DQO	COT	NT	Amonio NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	Nitrato NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	Fosfato PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	Fenoles	
Remoción (%)	83.84	84.62	29.82	8.34	76.74	40.2	89.34	
Concentración final (ppm)	4040	800	4048	1523	367	43	8.9	

<sup>a</sup> El factor de deseabilidad compuesto se define como el grado en el que el sistema optimiza de manera conjunta las funciones objetivo. Tiene un valor entre 0 y 1; donde 1 representa el caso ideal en el que todas las funciones objetivo fueron alcanzadas en un 100%, y 0 indica que 1 o más de las respuestas deseadas están fuera de los límites establecidos. Para este caso en concreto, los factores se ponderaron de forma equitativa, por lo que el factor de deseabilidad compuesto corresponde al grado promedio de satisfacción de cada función objetivo.

Como se observa en la tabla, el proceso de optimización arroja un porcentaje de deseabilidad de las variables optimizadas del 55.5%. Esto se debe a que variaciones en las variables independientes, la relación molar de peróxido, principalmente, genera un mayor contenido de compuestos tóxicos en el agua tratada o una reducción de nutrientes que puedan ser reciclados en cultivos algales. Igualmente, el resultado demuestra que, en el proceso de oxidación hidrotermal con peróxido, la relación molar de oxidante es la variable de proceso más importante y que el valor óptimo de esta se ajusta exactamente al valor estequiométrico según la DQO del agua residual que se desea tratar.

A pesar de que el tiempo de residencia de la reacción no tiene la misma incidencia sobre los resultados del proceso oxidativo, como la relación molar de peróxido, el valor óptimo arrojado por el análisis está por debajo del valor central del diseño experimental (60 min) debido a que tiempos de contacto alto favorecen la reducción de nitrógeno y fósforo en agua. Este tiempo óptimo favorece de igual forma el costo del proceso de tratamiento, debido a que mantener condiciones de reacción cercanas al punto crítico del agua es una

de las principales desventajas que enfrenta este proceso avanzado de oxidación (Yanhui Li & Wang, 2020).

### 3.4 Conclusiones

En el presente capítulo, el trabajo experimental tuvo como objetivo investigar el efecto del tiempo de residencia y la relación molar de peróxido en el tratamiento hidrotermal del agua residual proveniente de la licuefacción hidrotermal de microalgas, para mejorar su calidad y maximizar la recirculación de agua y nutrientes a futuros cultivos de microalgas. Para este propósito, se empleó el agua residual obtenida de la LHT de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 y se aplicó la metodología de superficie de respuesta para evaluar los efectos individuales e interactivos de los dos parámetros de operación de la oxidación hidrotermal con peróxido sobre la decoloración y las tasas de reducción de materia orgánica (DQO y COT), nitrógeno (nitrógeno total, amonio y nitrato), fósforo (fosfato) y fenoles, para optimizar el proceso de tratamiento. Las funciones de los modelos, derivadas de los datos experimentales, demostraron que a las condiciones de reacción empleadas (350°C, 164 bar) el efecto de la relación molar de peróxido es más significativo que el tiempo de residencia para la remoción de cada compuesto. En ausencia de oxidante, el tratamiento mejora la calidad general del efluente, pero no hay remoción de compuestos fenólicos, que son tóxicos e inhiben el crecimiento de las algas. En condiciones de exceso de peróxido, se alcanzan remociones hasta del 100% de fenoles y materia orgánica, pero hay nutrientes que se pierden como gases (nitrógeno molecular) o como sólidos (sales de fósforo). Los resultados experimentales pudieron ser comparados con otros resultados encontrados en la literatura, permitieron un buen ajuste de superficies de respuesta y demostraron la utilidad de este tipo de metodología para optimizar el proceso de tratamiento de aguas residuales planteado. La optimización de variables indica que la mejor calidad de la fase acuosa, con fines de recuperación de nutrientes, se obtiene a un tiempo de residencia de 39 minutos, empleando la relación estequiométrica de oxidante. Para tener un mejor entendimiento sobre el efecto del tiempo de reacción, se recomienda mejorar las rampas de calentamiento del reactor o el precalentamiento de los reactivos por separado.



## **4. Recirculación y valorización de la fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de la microalga *C. vulgaris***

En el presente capítulo se evaluará la efectividad del tratamiento hidrotermal con peróxido de la fase acuosa obtenida de la licuefacción hidrotermal de microalgas por medio de cultivos seriados de la microalga *C. vulgaris* UTEX 2714 en diferentes diluciones de la fase acuosa tratada. El objetivo último es establecer las condiciones operativas de un proceso de producción de biocrudo basado en microalgas, que integre la recirculación de agua y nutrientes a los cultivos de microalgas para garantizar la sostenibilidad ambiental y económica del proceso de licuefacción hidrotermal. Para ello, un análisis energético simplificado del proceso se llevo a cabo tomando como base algunos datos de la literatura y los resultados presentados en los capítulos anteriores.

### **4.1 Introducción**

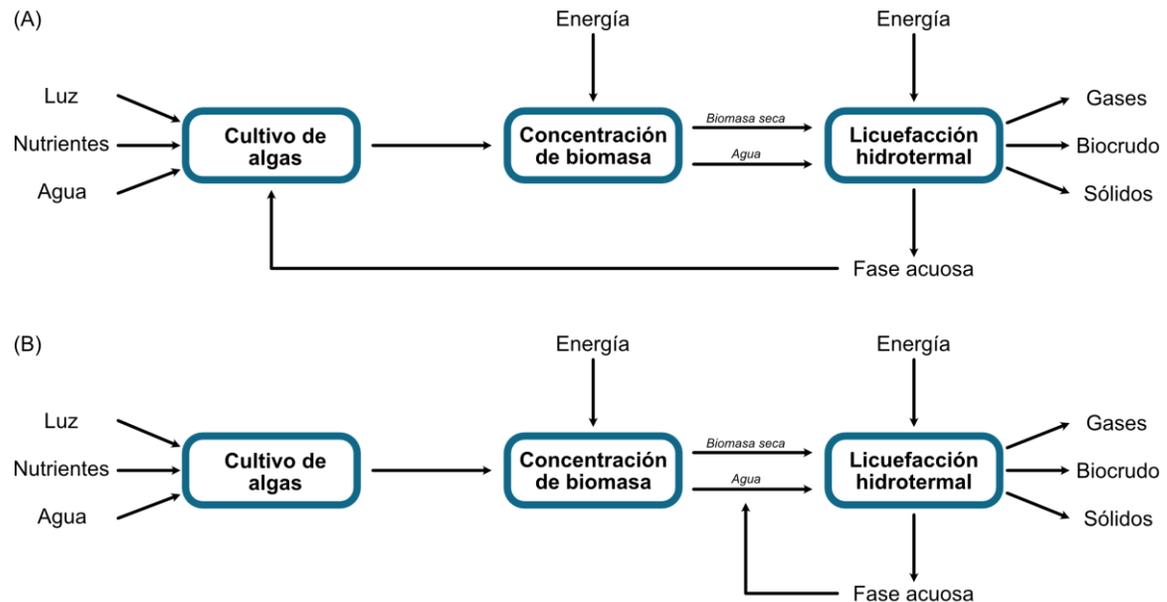
La licuefacción hidrotermal es un proceso de conversión térmica en el que la biomasa se transforma en un combustible líquido, a la par que sólidos, gases y productos acuosos se obtienen como subproducto. El principal producto de la LHT es el biocrudo, un combustible

con propiedades fisicoquímicas similares a las del petróleo de origen fósil. En este proceso, el uso de agua representa su principal ventaja y desventaja. Al ser un proceso húmedo, no hay necesidad de secar biomásas con altos contenidos de humedad previo al tratamiento. El agua presente en la biomasa bajo condiciones de reacción cercanas al punto crítica de la misma, ocasiona que esta actúe a la vez como solvente de la materia orgánica y reaccione con ella. Sin embargo, el coste de mantener tales condiciones de reacción y la generación de grandes volúmenes de agua residual que requiere un tratamiento posterior, exigen que esta tecnología para obtener biocombustibles sea optimizada para ser costo-efectiva.

En los últimos años, la investigación en este campo se ha enfocado justamente en incrementar los rendimientos de producción de biocrudo y sus propiedades, la valorización de los subproductos del proceso y la optimización general del proceso. En la LHT, la mayoría de moléculas orgánicas de la biomasa algal sirven como materia prima del proceso, para ser hidrolizadas en moléculas más pequeñas que luego, por reacciones de condensación y polimerización, desembocan en la formación de hidrocarburos (Leng & Huang, 2018). Las demás moléculas y elementos presentes en la biomasa permanecen en el agua en forma de sales disueltas, ácidos orgánicos, aldehídos, compuestos aromáticos y cíclicos, fenoles, etc. El tipo y concentración de estos compuestos depende de las condiciones de reacción de la LHT y de la composición bioquímica de la biomasa empleada (Zhuang et al., 2019). Estos compuestos orgánicos y otros productos intermediarios que permanecen en el agua resultan en una gran demanda química de oxígeno, por lo que tratamiento adicional debe ser llevado a cabo, previo a la descarga de este tipo de agua residual (Becker et al., 2014). Zhu et al. (2014) encontraron que la disposición de residuos generados durante la LHT de biomasa representa el 30% de los costos operativos, dentro de los cuales el tratamiento de la fase acuosa contribuye en más de un 90%. Es por esto por lo que, la optimización de tecnologías hidrotermales para la producción de biocombustibles debe tener en consideración métodos para tratar y reutilizar la fase acuosa generada durante el proceso.

Con el fin de valorizar la fase acuosa de la LHT, los autores se han centrado principalmente en (1) estudiar el efecto de recircular la fase acuosa como solvente para nuevas reacciones de licuefacción, con el fin de incrementar los rendimientos de producción de biocrudo; y (2)

la recirculación de la fase acuosa para recuperar nutrientes y producir nueva biomasa para alimentar el proceso de LHT (Figura 4-1).



**Figura 4-1. Esquema de las metodologías más estudiadas para valorizar la fase acuosa de la LHT.**

(A) Recirculación para la producción de biomasa algal. (B) Recirculación como medio reactivo de la LHT

#### 4.1.1 Recirculación como medio reactivo de la LHT

La recirculación de la fase acuosa como medio reactivo para la licuefacción es atractiva debido a que se incrementan los rendimientos de producción de biocrudo mientras se minimiza la descarga de agua residual, mejorando la factibilidad económica y ambiental global del proceso.

En general, los estudios han encontrado que, para la mayoría de las biomásas, la recirculación de la fase acuosa incrementa el rendimiento de producción de biocrudo. Por ejemplo, incrementos de aproximadamente 5% se observaron al recircular la fase acuosa de la LHT de desechos de bayas, debido a la saturación del agua residual con compuestos orgánicos ligeramente polares (Deniel et al., 2016). Resultados similares fueron encontrados durante la LHT de otros residuos agroindustriales (X. Chen et al., 2018; Kabadayi et al., 2017). Por otra parte, Hu et. al (2017) obtuvieron un incremento del 6% en la producción de biocrudo al recircular la fase acuosa de microalgas. La mayor productividad se debió a una mayor transformación de compuestos reactivos presentes en el agua en biocombustible.

Otros estudios han ido más allá y han analizado el efecto de recircular más de una vez el agua residual de la LHT. Estudios sobre la LHT de material lignocelulósico demostraron que, después de recircular la fase acuosa por tres ciclos de licuefacción, el rendimiento de biocrudo se mejoró en un 17% (C. Li et al., 2013; Z. Zhu et al., 2015). Incrementos similares fueron hallados cuando la recirculación del agua residual se prolongó durante siete y nueve ciclos de reacción (Armandina et al., 2015; Patrick Biller et al., 2016).

La recirculación de la fase acuosa favorece una mayor producción de biocrudo debido a la presencia de ácidos orgánicos y metales alcalinos en el agua residual. Estos, favorecen las reacciones de hidrólisis y funcionan como catalizador de la reacción, incrementando la degradación de macromoléculas, la menor formación de residuos sólidos, y un menor contenido de nitrógeno en el biocrudo, mejorando su estabilidad (Hu et al., 2017; C. Xu & Lad, 2008).

A pesar de que la recirculación de la fase acuosa como medio reactivo de la LHT es ventajosa en términos de producción de biocrudo y uso de agua, no elimina la necesidad de tratar el agua una vez los ciclos reactivos son completados. La fase acuosa resultante de los procesos de recirculación es de más baja calidad debido a la acumulación constante de compuestos orgánicos disueltos, nutrientes y compuestos tóxicos; por lo que procesos avanzados de tratamiento son necesarios para su posterior descarga al medio ambiente (Hu et al., 2017).

#### **4.1.2 Recirculación como medio de cultivo de microalgas**

Teniendo en cuenta que las microalgas son capaces de desarrollarse en aguas residuales, la recirculación de la fase acuosa de la LHT como medio de cultivo de estas, permite la integración de la producción de biocrudo con el tratamiento de aguas, mediante la recuperación de nutrientes (Erkelens et al., 2015b). La fase acuosa resultante de la licuefacción de microalgas se caracteriza por contener más del 70% de los nutrientes contenidos en la biomasa (P y N) y una gran cantidad de compuestos orgánicos disueltos, por lo que su valorización es vital para el balance energético positivo del proceso de producción de biocrudo (W.-T. Chen et al., 2016; Gai et al., 2014). Diversos estudios han

evaluado el reciclaje de nutrientes y carbono por medio del cultivo de algas en esta fase acuosa, encontrando que grandes factores de dilución son necesarios para el correcto desarrollado de la biomasa algal (Arun et al., 2018).

Por ejemplo, una productividad de  $0.21 \text{ g L}^{-1}$  se alcanzó para cultivos de *Desmodesmus sp.* que contenían la fase acuosa diluida en un factor de 20 (Garcia et al., 2013). El doble de productividad de biomasa algal fue reportado por Jena et. al (2011b) para *C. minutissima*, al diluir la fase acuosa 500 veces. Resultados similares fueron obtenidos en otros estudios que emplearon la misma microalga y el mismo factor de (P Biller et al., 2012; Du et al., 2012). Todos los autores concuerdan en que los grandes factores de dilución requeridos para cultivar microalgas en la fase acuosa resultante de la LHT se deben a los altos contenidos de nitrógeno como amoniaco, fenoles y metales como níquel, que inhiben y alteran el desarrollo de biomasa algal (Azov & Goldman, 1982; Fiorentino et al., 2003; Garcia et al., 2013).

Los estudios de recirculación de la fase acuosa para ser valorizada por medio de microalgas se han enfocado en encontrar factores de dilución óptimos que permitan el desarrollo de estas; sin embargo, (1) los nutrientes presentes en la fase acuosa son diluidos igualmente, por lo que es necesario suplementar nuevas sales a los tanques de cultivo y (2) son pocas las investigaciones sobre pretratamientos de esta fase acuosa para eliminar componentes tóxicos previo al cultivo de microalgas.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Condiciones de cultivo

Para los ensayos comparativos de crecimiento, la microalga se cultivó en botellas planas de vidrio (referencia L-3222 del catálogo de Unicor S.A., con capacidad de 375 mL, alto x ancho x profundo = 178.05 x 89.37 x 45.4 cm), empleando medio de cultivo BBM estéril, suplementado con diferentes volúmenes de la fase acuosa de la LHT obtenida luego del tratamiento FA<sub>19</sub> (Tabla 3-2). Se escogió la fase acuosa obtenida luego de este tratamiento debido a que las condiciones de reacción empleadas ( $t = 60 \text{ min}$ ,  $\varnothing = 1.0$ ) son las más cercanas a las condiciones óptimas para la oxidación hidrotermal con peróxido

establecidas en el capítulo anterior ( $t = 39.01$  min,  $\emptyset = 1.035$ ). Los cultivos se realizaron con burbujeo de aire a razón de 1 vvm, temperatura constante de 25°C, luz artificial LED blanca con una intensidad de 6000 lux y fotoperiodo 12h/12h, por 14 días.

Paralelamente, se mantuvo un cultivo de control de crecimiento de la microalga en medio BBM estéril. Como referencia, cultivos seriales de la microalga fueron mantenidos en medio BBM estéril suplementado con la fase acuosa sin ningún tratamiento. Las condiciones de cultivo fueron las mismas para los tres casos.

Durante los primeros siete días se tomaron muestras diarias del cultivo y posteriormente las muestras se tomaron cada dos días. El crecimiento de la microalga se cuantificó por medio de medidas de absorbancia a 684 nm y se expresó como el número de células por mililitro de muestra, empleando una curva de calibración.

## 4.2.2 Diseño experimental

Diferentes diluciones de la fase acuosa tratada y sin tratar se realizaron con medio BBM para llevar a cabo los cultivos comparativos de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*. Cada fase acuosa se esterilizó por filtración con membranas de tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$  antes de ser suplementada en los medios de cultivo. En total, seis diluciones de cada fase acuosa fueron analizadas (25x, 50x 100x, 200x, 400x y 800x) junto con los cultivos control.

**Tabla 4-1. Proporción de fase acuosa y medio BBM para los cultivos comparativos de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.**

$V_{AF(t)}$ , volumen de fase acuosa tratada (t) y sin tratar;  $V_{BBM}$ , volumen de medio BBM;  $V_{inoc}$ , volumen de inóculo

Nomenclatura	$V_{AF(t)}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{BBM}$ (mL)	$V_{inoc}$ (mL)
25x	9615	215.385	25.0
50x	4902	220.098	25.0
100x	2475	222.525	25.0
200x	1244	223.756	25.0
400x	623	224.377	25.0
800x	312	224.688	25.0

La nomenclatura de cada dilución indica las partes de medio BBM respecto a una parte de la fase acuosa suplementada (i.e. 25x, corresponde a un medio de cultivo en el que hay 1 mL de fase acuosa por cada 25 mL de medio BBM). En la Tabla 4-1 se presentan las proporciones empleadas para cada dilución empleada.

### 4.2.3 Efecto del factor de dilución sobre la velocidad específica de crecimiento

Para definir cuál es el factor de dilución que maximiza la productividad de biomasa algal, se analizó el efecto de la cantidad de fase acuosa tratada que se suplementó al medio de cultivo, sobre la velocidad específica de crecimiento de la microalga *C. vulgaris*. Para ello, en primer lugar, se calculó la velocidad específica de crecimiento diaria, para cada cultivo mantenido con diferentes volúmenes de la fase acuosa tratada. Esta velocidad se calculó a partir de la (Ecuación 4-1; donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento,  $X_t$  y  $X_{t-1}$  corresponden a la concentración celular en dos tiempos consecutivos del muestreo, y,  $t_t$  y  $t_{t-1}$  son el tiempo en el que las dos muestras consecutivas del cultivo fueron tomadas, respectivamente.

$$\mu = \frac{\ln(X_t) - \ln(X_{t-1})}{t_t - t_{t-1}} \quad (\text{Ecuación 4-1})$$

En seguida, se graficó la velocidad específica de crecimiento obtenida respecto al tiempo de cultivo y se determinó el unto a partir del cual la velocidad se mantuvo constante. A partir de este punto, se promediaron todos los datos de  $\mu$  hasta el final del tiempo de cultivo para cada dilución de fase acuosa empleada. Finalmente, se graficó la velocidad específica promedio respecto al factor de dilución estudiado y se definió la cantidad de fase acuosa suplementada que maximiza y mejora la productividad de microalgas respecto al cultivo control en medio estándar BBM.

#### 4.2.4 Análisis energético

Al final, los resultados obtenidos durante el presente trabajo se integran en el análisis energético del proceso de producción de biocrudo a partir de microalgas, comparando dos escenarios: el tratamiento por oxidación hidrotermal con peróxido para tratar y descartar la fase acuosa de la LHT; y el tratamiento hidrotermal con peróxido para recircular parte de la fase acuosa tratada a los cultivos de microalgas. El inventario de datos empleados para el análisis se presenta en la Tabla 4-2.

**Tabla 4-2. Inventario de datos para la integración energética de la oxidación hidrotermal con peróxido con la LHT de microalgas**

<b>Etapa</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>	<b>Referencia</b>
<b>Cultivo de microalgas</b>			
Inyección de gases	0.104	MJ · kg <sup>-1</sup> alga p.s.	(Collet et al., 2011)
Consumo eléctrico del sistema	0.720	MJ · kg <sup>-1</sup> alga p.s.	
Requerimiento de nitrógeno	0.412	g · L <sup>-1</sup> de cultivo	Presente trabajo
Requerimiento de fósforo	0.053	g · L <sup>-1</sup> de cultivo	
<b>Cosecha por centrifugación</b>			
Consumo eléctrico	0.15	MJ · kg <sup>-1</sup> alga p.s.	(Collet et al., 2011)
Sólidos a la descarga	10 %	kg alga p.s. · kg <sup>-1</sup> lodo algal	Presente trabajo
<b>Licuefacción hidrotermal</b>			
Temperatura	350	°C	
Tiempo de reacción	30	min	
Concentración de sólidos	10%	kg alga p.s. · kg <sup>-1</sup> lodo algal	Presente trabajo
Rendimiento de biocrudo	37.54%	kg biocrudo · kg <sup>-1</sup> alga p.s.	
Rendimiento de fase acuosa (FA)	10.02%	kg FA · kg <sup>-1</sup> alga p.s.	
Consumo energético	11.466	MJ · kg <sup>-1</sup> biocrudo	(Frank et al., 2013)
<b>Oxidación hidrotermal con peróxido</b>			
Tiempo de reacción	60	min	
Relación molar de peróxido	1.0	-	
Concentración del peróxido	30%	p/v	
DQO de fase acuosa	26,248	mg O <sub>2</sub> · L <sup>-1</sup>	Presente trabajo
Rendimiento de gases	12.75%	kg gases · kg <sup>-1</sup> FA.	
Concentración de N en FA tratada	367	ppm N	
Concentración de P en FA tratada	43	ppm P	
Consumo energético	0.252	MJ · kg <sup>-1</sup> de DQO removido	(Frank et al., 2013)

Para el análisis, se contemplaron 4 etapas en el proceso productivo de biocrudo (cultivo, cosecha, licuefacción hidrotermal y, oxidación hidrotermal con peróxido) y se partió de una base de cálculo de 1000 L de cultivo de algas. En general, los consumos energéticos específicos de cada etapa se tomaron de estudios previos de análisis de ciclo de vida; y los datos de rendimiento, productividad y composición fueron tomados de los resultados del presente trabajo. En ambos escenarios, solo se contempla el tratamiento y valorización de la fase acuosa de la LHT. Aunque los gases producidos durante la LHT y la OHP son valorizables, al igual que los sólidos resultantes de la licuefacción; su aporte energético no se contempla dentro del balance de energía global del proceso. Al final, el balance de energía global se realiza a partir del consumo energético de cada una de las etapas y de la energía que se puede obtener a partir del biocrudo producido.

#### **4.2.4.1. Cultivo de microalgas**

En los dos escenarios se asume una producción a gran escala de microalgas empleando medio BBM y un sistema de cultivo abierto tipo *raceway*. En el primer escenario, la productividad de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 en medio estándar BBM es  $0.64 \text{ g p.s.} \cdot \text{L}^{-1}$ . Al considerar el segundo escenario, se asume que la productividad de la microalga es un 21% mayor, debido a los efectos positivos de recircular la fase acuosa tratada de la LHT. Este incremento en la productividad de biomasa seca se asume idéntico al incremento de la velocidad específica de crecimiento de la microalga cuando se cultivó en medio BBM suplementado con fase acuosa tratada a una dilución de 100x, como se mostró en el capítulo anterior.

#### **4.2.4.2. Cosecha de microalgas**

En los dos escenarios, la cosecha de la microalga se realiza por centrifugación en una centrifuga de discos espirales. Collet et al. (2011) establecen que la energía requerida para obtener una pasta de microalgas con una concentración de sólidos del 30% p.s., a partir de un cultivo de microalgas con una concentración de sólidos del 0.05%,  $1 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$  alga p.s. En los casos de estudio presentados, la concentración de sólidos iniciales varía entre 0.064 y 0.077%, y se busca una concentración final en la pasta algal del 10%. A partir de estos valores, se realizaron los cálculos respectivos y se estableció que la energía

necesaria para centrifugar la biomasa en los escenarios sin y con recirculación de la fase acuosa es de 0.012 y 0.009 MJ · kg<sup>-1</sup> alga p.s., respectivamente.

#### **4.2.4.3. Licuefacción hidrotermal**

Para el análisis energético de la LHT se consideraron las condiciones de reacción establecidas en el capítulo 2 del presente trabajo, así como los resultados de rendimiento de fases, poder calorífico del biocrudo y composición de la fase acuosa resultante. En los dos escenarios no se considera la recirculación de la fase gaseosa, como fuente de CO<sub>2</sub>, a los cultivos de microalgas; ni el uso de los sólidos resultantes de la reacción como fuente de nutrientes.

#### **4.2.4.4. Oxidación hidrotermal con peróxido**

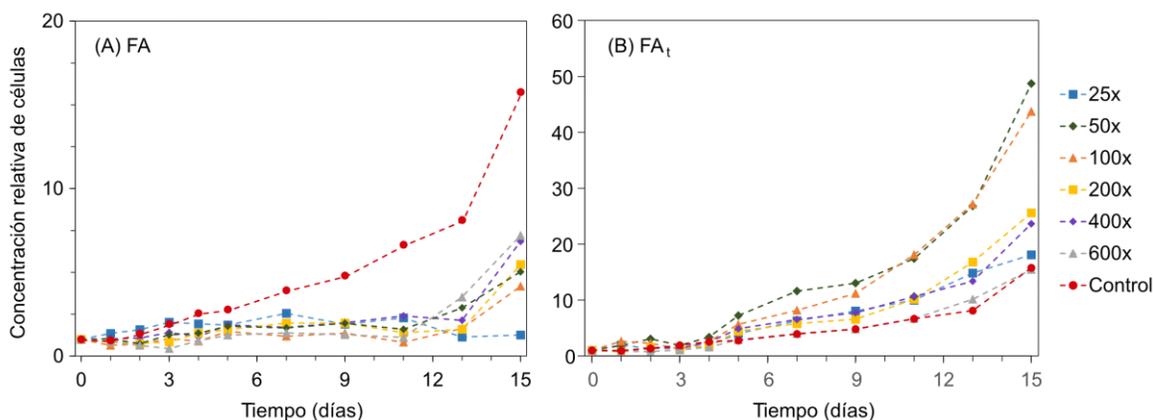
En los dos escenarios, se considera que la OHP se lleva a cabo con el tiempo de reacción y relación molar de peróxido óptimos para el tratamiento de la fase acuosa de LHT, como se presentó en el capítulo 3. En el primer escenario, se establece como objetivo del tratamiento hidrotermal el contenido final de DQO en la fase acuosa tratada. Esto se debe, a que el límite máximo permitido de DQO en aguas residuales provenientes de la industria de petróleo es de 5800 ppm, según la legislación colombiana (Resolución 631-2015, 2015). En el segundo escenario, se establece la recirculación parcial de la fase acuosa tratada para obtener una dilución que maximiza el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*.

### **4.3 Resultados y análisis**

#### **4.3.1 Análisis comparativo de crecimiento**

La microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 se cultivó en medio de cultivo BBM suplementado con diferentes cantidades de fase acuosa de la LHT sin tratar. Los resultados muestran que, para todas las diluciones estudiadas de la fase acuosa, la concentración celular relativa de la microalga siempre fue inferior a la del cultivo control en medio BBM (Figura 4-2 A). Dentro de los cultivos suplementados con fase acuosa, al cabo

de 15 días de mantenimiento, el máximo crecimiento se presentó a las razones de dilución más altas (400x y 600x). Por el contrario, el crecimiento fue nulo en el cultivo con más presencia de fase acuosa (25x).



**Figura 4-2. Cultivos comparativos de la microalga *C. vulgaris* en la fase acuosa resultante de la LHT antes y después del tratamiento de oxidación hidrotermal con peróxido.**

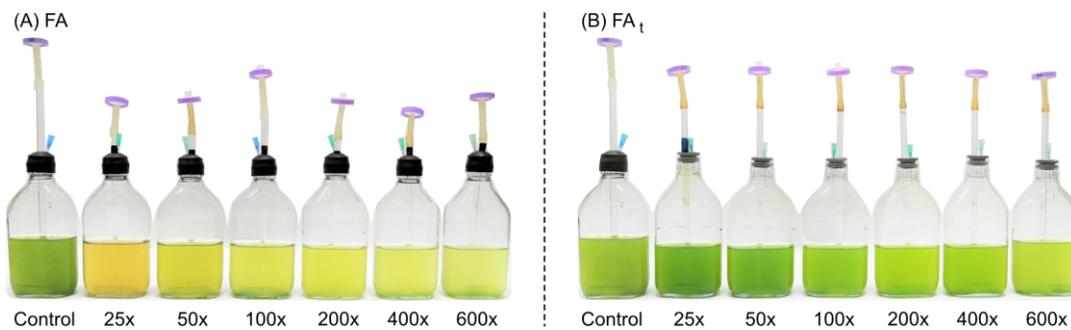
(A) Cultivos en diluciones de la fase acuosa sin tratar (FA). (B) Cultivos en diluciones de la fase acuosa tratada mediante oxidación hidrotermal con peróxido (FA<sub>t</sub>,  $\phi = 1.0$ ,  $t = 60$  min). La concentración inicial promedio de microalgas para cada ensayo fue de  $1.8 \pm 0.4$  millones células  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>

En general, la adición de fase acuosa de LHT a los cultivos algales prolonga la fase de latencia de la microalga *C. vulgaris*. Al cabo de 12 días de cultivo en medio suplementado con fase acuosa sin tratar, la microalga es capaz de crecer a un ritmo aparentemente constante e independiente de la cantidad de fase acuosa administrada al inicio del ensayo (excepto para la dilución más baja de 25x). Estos resultados sugieren que la cepa algal en cuestión es capaz de adaptarse al medio BBM suplementado con fase acuosa de LHT. Resultados similares han sido reportados por otros autores para otras cepas de microalga cultivadas en diferentes diluciones de la fase acuosa resultante de LHT (P Biller et al., 2012; Du et al., 2012; García et al., 2013; L. Zhang, Lu, Zhang, Li, Liu, Duan, et al., 2016).

Adicionalmente, se encontró que factores de dilución por debajo de 25x además de inhibir el crecimiento celular resultan tóxicos para las microalgas. Este fenómeno se debe, principalmente, a la presencia de compuestos fenólicos y derivados nitrogenados. En primer lugar, la concentración de compuestos fenólicos en la fase acuosa, resultantes de la degradación de carbohidratos durante la LHT, es suficiente para inhibir el crecimiento

algal (Azov & Goldman, 1982; Fiorentino et al., 2003; García et al., 2013). Los fenoles, como demostraron Megharaj et al. (1992), inhiben la producción de clorofila de las microalgas y por ende limitan su actividad fotosintética y desarrollo, resultando en una decoloración de las microalgas (

Figura 4-3 A). Por otra parte, las proteínas son transformadas en compuestos nitrogenados (indol, pirazinas, piridinas, etc.) y amonio, los cuales resultan tóxicos para las microalgas si no son diluidos adecuadamente (P. Biller et al., 2012; T. M. Brown et al., 2010; García Alba et al., 2012; Savage et al., 2011; Scragg, 2006).



**Figura 4-3. Coloración resultante de los cultivos comparativos de la microalga *C. vulgaris* en medio de cultivo BBM suplementado con fase acuosa de la licuefacción hidrotermal de la misma microalga.**

(A) Cultivos en diluciones de la fase acuosa sin tratar (FA). (B) Cultivos en diluciones de la fase acuosa tratada mediante oxidación hidrotermal con peróxido (FA<sub>t</sub>,  $\phi = 1.0$ ,  $t = 60$  min). Fotografías tomadas al final del día 15 de cultivo.

Al mismo tiempo, la microalga se cultivó en diferentes diluciones de la fase acuosa tratada mediante una oxidación hidrotermal con peróxido, llevada a cabo durante 60 minutos y con una relación molar de peróxido de hidrógeno de 1.0. Los resultados para el crecimiento comparativo son presentados en la Figura 4-2 (B). En esta ocasión, la adición de fase acuosa tratada al medio de cultivo resultó en un crecimiento algal que, como mínimo, se asemeja al crecimiento de la microalga en medio BBM sin suplementar. Esta mejora respecto a los cultivos suplementados con fase acuosa sin tratar se debe a la reducción de compuestos fenólicos y nitrogenados presentes en el agua, durante la oxidación hidrotermal con peróxido.

A las condiciones de reacción mencionadas, hay una reducción de 29.82% y 89.34% del nitrógeno total y de fenoles, respectivamente. Por un lado, la concentración de amonio en

la fase acuosa tratada sin diluir (1523 ppm  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) es lo suficientemente baja como para no inhibir el crecimiento de la microalga. En este sentido, Wang et al. (2019), en su estudio sobre la inhibición por amonio de diferentes variedades de la microalga *Chlorella*, concluyeron que el rango de tolerancia de amonio para esta familia de microalgas es 0.4 – 1.6 mg N L<sup>-1</sup>. Así, aun si la fase acuosa no fuese diluida para llevar a cabo nuevos cultivos algales, la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 sería capaz de crecer en la fase acuosa tratada, proveniente de la LHT.

Por otra parte, después del tratamiento hidrotermal con peróxido, la concentración de fenoles en la fase acuosa se reduce hasta un valor de 8.9 ppm. Al igual que sucede con el amonio, la tolerancia a compuestos fenólicos depende de la especie algal en cuestión. Por ejemplo, un estudio reportó que la concentración de fenol requerida para inhibir en un 50% el crecimiento de la microalga *P. subcapitata* fue de 5.7 ppm durante 72 horas de crecimiento (EC50 = 5.7 ppm) (Environment Agency, 2007). Por su parte, Shigeoka et al. (1988), obtuvieron un EC50 de 6.62 ppm al estudiar el efecto del fenol sobre el crecimiento de la microalga *C. vulgaris*. Así, para el presente estudio se tiene que la fase acuosa tratada, sin diluir, contiene una concentración de fenol cercana al EC50 reportado para otras algas verdes, por lo que, al realizar diluciones de esta fase acuosa con medio BBM, el crecimiento de la microalga no se ve limitado y por ende, el crecimiento mínimo esperado para la cepa estudiada correspondería con el crecimiento en medio BBM estándar, tal como se aprecia en la Figura 4-2 (B).

Adicionalmente, al comparar el crecimiento de la microalga en medio de cultivo suplementado con fase acuosa tratada y sin tratar, se observa que la microalga no solo fue capaz de crecer en medio BBM suplementado con fase acuosa tratada, sino que este crecimiento fue mejorado respecto al cultivo control. Este mayor desarrollo de la microalga *C. vulgaris*, en medio de cultivo con fase acuosa tratada, se debe a la capacidad de crecimiento mixotrófico de esta cepa algal. Son variados los estudios que demuestran el potencial mixotrófico de la microalga *C. vulgaris*, es decir, que posee la capacidad de utilizar compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de carbono y energía (Abreu et al., 2012; Heredia-arroyo et al., 2011; Liang et al., 2009).

Considerando que la fase acuosa, resultante de la oxidación hidrotermal con peróxido, presenta una concentración de carbono orgánico total de 800 ppm, es válido afirmar que

la microalga estudiada tuvo predilección por el COT como fuente de carbono, en lugar del dióxido de carbono atmosférico. Esto se debió a que las condiciones de cultivo mixotróficas se vieron favorecidas, lo que conllevó a un mayor crecimiento algal. En este orden de ideas, Liang et al. (2009), compararon el crecimiento auto-, hetero- y mixotrófico de la microalga *C. vulgaris*, cultivada en medio suplementado con 1% p/v de glucosa, y encontraron que el crecimiento óptimo y la mayor productividad lipídica se dan en condiciones mixotróficas.

A pesar de estos resultados, la mayoría de autores reportan que el carbono presente en la fase acuosa después de la oxidación hidrotermal se presenta, mayoritariamente, como ácidos orgánicos de bajo peso molecular en lugar de glucosa (Debellefontaine et al., 1996; Márquez et al., 2018). Por lo que, análisis comparativos de crecimiento mixotrófico de la microalga con ácidos orgánicos como fuente de carbono, deben ser tenidos en cuenta. Investigadores de la Universidad de Uttar Pradesh en India, encontraron que la microalga verde *C. pyrenoidosa* tuvo una productividad algal seis veces mayor cuando se cultivó en medio con acetato de sodio ( $10 \text{ g cm}^{-3}$ ), respecto a cultivos control en condiciones autotróficas (Rai et al., 2013).

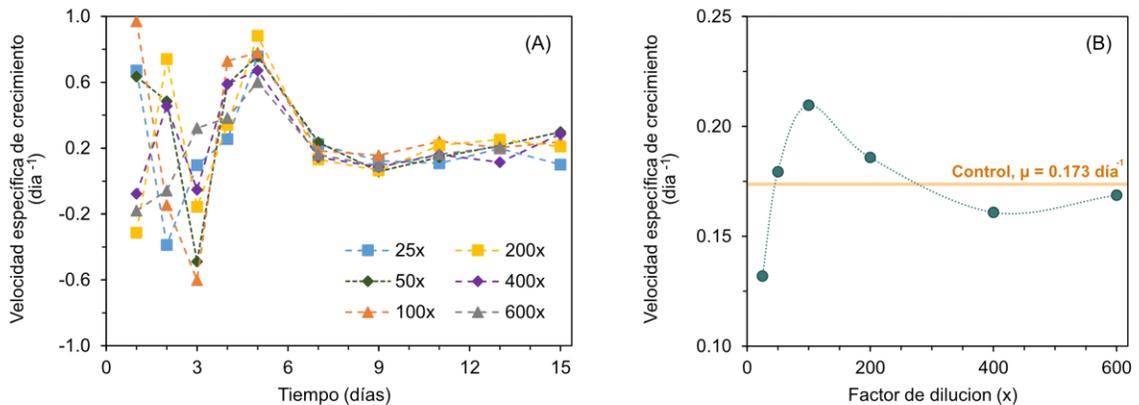
Por su parte, Liang et al. (2009) encontraron que, a pesar de que el crecimiento en acetato no fue el más alto, la productividad de biomasa de la microalga *C. vulgaris* incrementó 4 veces respecto a cultivos sin fuente orgánica de carbono; y además, mencionan una mayor productividad de lípidos debido a que el acetato es convertido en ácidos grasos directamente. Finalmente, resultados similares son reportados en otros estudios, donde, además, se resalta la posibilidad de la microalga *C. pyrenoidosa* de consumir amonio como fuente nitrógeno, cuando hay presencia de acetato en el medio de cultivo (L. Liu et al., 2018)

En resumen, se tiene que, el tratamiento hidrotermal con peróxido reduce la concentración de compuestos tóxicos, permitiendo la adaptación y desarrollo de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714. Igualmente, el tratamiento incrementa la disponibilidad de nutrientes necesarios para el desarrollo de la microalga, principalmente el carbono. Las condiciones oxidantes del tratamiento ocasionan que la degradación de moléculas orgánicas presentes en la fase acuosa resulten en ácidos orgánicos, los cuales pueden ser asimilados por la

microalga. Lo anterior, junto con la capacidad mixotrófica de la microalga, permiten que la fase acuosa resultante de la LHT de microalgas, tratada mediante una oxidación hidrotermal con peróxido, pueda ser recirculada a los tanques de cultivo de algas, produciendo una mayor productividad de biomasa, con una probable mayor concentración de lípidos.

### 4.3.2 Máxima dilución de recirculación

Los resultados presentados en la Figura 4-2 (B) sugieren que hay un valor de dilución de la fase acuosa tratada para el cual, la producción de biomasa algal es máxima. Teniendo en cuenta que la fase acuosa se trata para ser recirculada a los cultivos de microalgas, es conveniente saber que tanto se debe diluir esta, para garantizar la continuidad, y posible mejora, del proceso de producción de biocrudo algal.



**Figura 4-4. Efecto de la fase acuosa tratada de la LHT sobre la velocidad específica de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714.**

(A) Variación de la velocidad específica de crecimiento a lo largo del tiempo de cultivo para diferentes diluciones de la fase acuosa tratada de la LHT. (B) Efecto del factor de dilución de la fase acuosa tratada sobre la velocidad específica de crecimiento de la microalga *C. vulgaris*. La banda naranja señala la velocidad específica de crecimiento promedio para el cultivo control en medio BBM.

Como era de esperarse, los cultivos comparativos de crecimiento de la microalga *C. vulgaris* en fase acuosa tratada presentaron una fase de latencia en la cual, la cepa algal estudiada se adaptó al nuevo medio de cultivo. Durante este tiempo, la velocidad específica de crecimiento fue muy variable debido a que algunas de las células murieron

mientras que otras fueron incapaces de duplicarse, tal como se puede apreciar en la Figura 4-4 (A). Es solo a partir del tercer día de cultivo que la microalga es capaz de comenzar su crecimiento exponencial, alcanzando una velocidad específica de crecimiento máxima al quinto día de cultivo, para todas las diluciones empleadas. La  $\mu_{\max}$  más alta se obtuvo para una dilución de 200x de la fase acuosa tratada ( $0.882 \text{ día}^{-1}$ ) y la más baja para la dilución de 600x ( $0.600 \text{ día}^{-1}$ ). A partir de este punto, la microalga sigue creciendo de forma exponencial a una  $\mu$  constante inferior a  $\mu_{\max}$ .

Considerando que la velocidad de crecimiento en la fase exponencial fue constante para todos los casos a partir del quinto de cultivo, la velocidad específica promedio se calculó entre los días 7 y 15, para determinar el factor de dilución que maximiza la velocidad de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714. Como se observa en la Figura 4-4 (B), la  $\mu_{\text{prom}}$  incrementa al incrementar el factor de dilución de la fase acuosa tratada hasta alcanzar un valor máximo en 100x ( $0.210 \text{ día}^{-1}$ ). A partir de este factor de dilución, la velocidad específica de crecimiento promedio comienza a decaer hasta alcanzar un valor cercano al obtenido para el cultivo control en medio BBM ( $0.173 \text{ día}^{-1}$ ). Este doble comportamiento se explica por la dilución de compuestos tóxicos y de nutrientes presentes en la fase acuosa de la LHT.

Para empezar, a bajos factores de dilución (25x) la concentración de fenoles y amonio en el medio de cultivo es lo suficientemente alta como para inhibir el crecimiento de la microalga (P. Biller et al., 2012; García-jarana et al., 2013; García Alba et al., 2012; Savage et al., 2011; Scragg, 2006). Si la dilución de la fase acuosa se duplica (50x), el efecto inhibitorio de los fenoles disminuye y comienza a ser evidente el efecto positivo del carbono orgánico en el medio cultivo sobre el crecimiento de la microalga. La velocidad específica de crecimiento obtenida a este factor de dilución se asemeja a la del cultivo control, por lo que, 50x es el mínimo factor de dilución necesario (20 mL de fase acuosa tratada por litro de medio BBM) para no afectar el crecimiento algal y garantizar el proceso productivo de biocrudo.

Cuando la dilución se incrementa hasta 100x, la concentración de fenoles es lo suficientemente baja como para no inhibir el crecimiento algal, por lo que esta, es capaz de desarrollarse y valerse de su naturaleza mixotrófica para incrementar hasta en un 21%

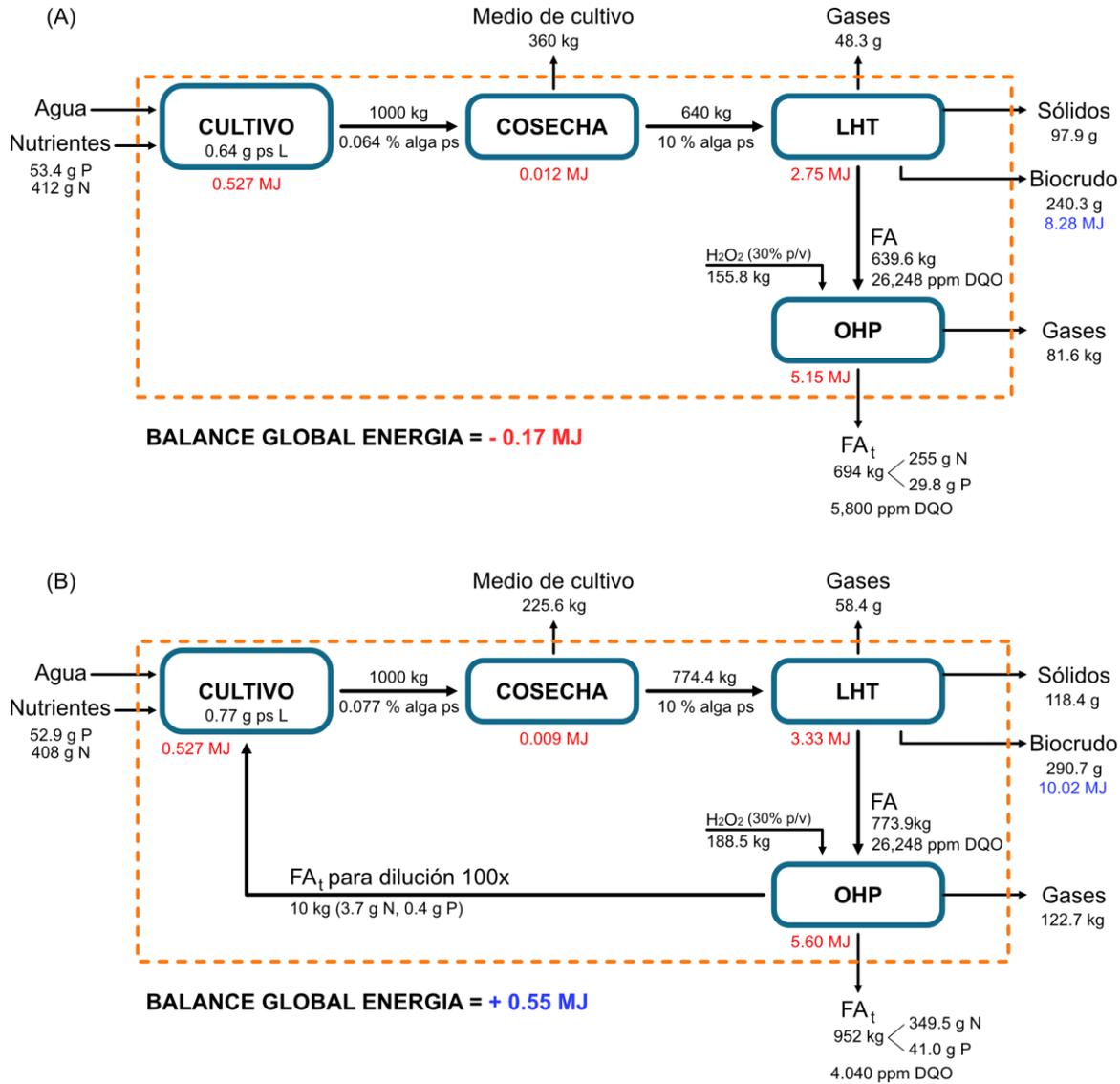
su velocidad específica de crecimiento respecto al cultivo control. Este es el factor de dilución que maximiza la producción de biomasa algal cuando esta se cultiva en medio suplementado con fase acuosa de la LHT tratada mediante la oxidación hidrotermal.

Al superar el umbral de 100x, la reducción de  $\mu_{prom}$  se debe a que los factores de dilución son tan fuertes (0 – 5 mL de fase acuosa tratada por litro de medio BBM), que la concentración de nitrógeno y materia orgánica aportadas por la fase acuosa son despreciables respecto a los nutrientes aportados por el medio BBM. Es por ello por lo que, al incrementar el factor de dilución,  $\mu_{prom}$  tiende al valor obtenido para el cultivo control en medio BBM. A pesar de que a estos factores de dilución aún se puede hacer uso de la fase acuosa para crecer microalgas, el tratamiento de esta y su recirculación a los cultivos algales no resultan viables económicamente. Por esta misma razón, 100x resulta ser el factor de dilución óptimo para recircular la fase acuosa a los cultivos de algas ya que, permite un mayor aprovechamiento de agua y nutrientes mientras incrementa la producción de biomasa y, por ende, la de biocrudo.

### **4.3.3 Integración energética del tratamiento hidrotermal de la fase acuosa resultante de la LHT**

Para integrar los resultados encontrados durante la licuefacción hidrotermal de la microalga *C. vulgaris*, junto con aquellos de la oxidación hidrotermal de la fase acuosa resultante y su subsecuente recirculación a los cultivos de microalgas, se procedió a realizar un análisis energético global del proceso planteado. Para establecer la importancia de recircular la fase acuosa tratada, los resultados obtenidos para el proceso circular se compraron con aquellos obtenidos de un proceso en el que el agua se trata para ser descargada completamente al ambiente (Figura 4-5).

Al analizar el caso en el que la fase acuosa no es recirculada, se encuentra que el proceso global de producción de biocrudo presenta un déficit energético de 0.17 MJ (Figura 4-5 A).



**Figura 4-5. Análisis energético del proceso de producción de biocrudo integrado con el tratamiento hidrotermal con peróxido de la fase acuosa resultante**

(A) Diagrama de proceso y balance de energía para el proceso de producción de biocrudo a partir de microalgas sin recirculación de la fase acuosa tratada mediante una oxidación hidrotermal con peróxido.

(B) Diagrama de proceso y balance de energía para el proceso de producción de biocrudo a partir de microalgas con recirculación de la fase acuosa tratada mediante una oxidación hidrotermal con peróxido.

La línea discontinua señala el límite de análisis. Los valores de energía en rojo corresponden a consumos energéticos y en azul a energía disponible. En ambos casos se señalan algunos datos de importancia para el balance de materia. LHT = Licuefacción hidrotermal, OHP = Oxidación hidrotermal con peróxido, FA = Fase acuosa, FA<sub>t</sub> = Fase acuosa tratada, DQO = Demanda química de oxígeno, P = Fosforo, N = Nitrógeno

El déficit de energía se debe al tratamiento de la fase acuosa de la LHT, puesto que la oxidación hidrotermal con peróxido es responsable de más del 60% de la energía total

requerida por el proceso. En este escenario, se valida que la producción de biocrudo a partir de microalgas es un proceso energéticamente viable, debido a que la energía que se puede obtener a partir del biocrudo compensa los gastos energéticos durante el cultivo, cosecha y transformación de la biomasa. Este resultado fue igualmente encontrado en un estudio anterior al comparar los procesos de producción de biodiesel y biocrudo a partir de microalgas (Boer & Moheimani, 2012). Igualmente, se corrobora que el tratamiento de la fase acuosa resultante es una de las principales desventajas de la LHT (X. Liu et al., 2013).

Cabe anotar que, a pesar de que se considere la oxidación hidrotermal con peróxido como método de tratamiento de la fase acuosa para ser dispuesta en el medio ambiente, la eficiencia energética del proceso puede ser mejorada si se realiza una integración energética más robusta, así como una intensificación de procesos. En este orden de ideas, Frank et al. (2013) mencionan que si se establece un proceso continuo en el que la LHT y la OHP ocurren en el mismo reactor, la energía requerida para llevar a cabo la oxidación hidrotermal reduce hasta en un 80%. Otros ahorros energéticos podrían llevarse a cabo si se emplean las corrientes resultantes de la reacción para precalentar los reactivos.

A pesar de que, en este escenario el grado de tratamiento de la fase acuosa es el necesario para alcanzar los límites de descarga establecidos por la legislación colombiana; la valorización de este efluente aún resulta atractiva. Considerando que más del 72% del fósforo y más del 85% nitrógeno, alimentados al sistema, permanecen en este efluente, su uso como fertilizante o como fuente de nutrientes para algas, podrían añadir más valor económico al proceso de producción de biocrudo o reducir los costos de producción de microalgas, respectivamente. Es por esto por lo que, en el segundo escenario se considera la recirculación parcial de la fase acuosa al cultivo de algas (Figura 4-5 B).

La recirculación de la fase acuosa es parcial debido a que, aun después de tratada, esta debe ser diluida para limitar los efectos inhibitorios de esta sobre el crecimiento algal. La fase acuosa que no es recirculada puede ser descartada sin mayores implicaciones medioambientales. Como se explicó anteriormente, la recirculación de la fase acuosa a un factor de dilución de 100x genera una mayor productividad de biomasa que al final permite una mayor producción de biocrudo y, por ende, un balance energético global positivo. El costo de producir biomasa con una mayor velocidad de crecimiento bajo las mismas condiciones de cultivo no afecta el consumo energético durante el cultivo, pero si disminuye

en un 25% los requerimientos de energía durante la cosecha, debido a que el gradiente de concentración de sólidos entre la entrada y la salida de la centrifuga disminuye.

Al producir más biomasa, el costo energético de llevar a cabo la licuefacción incrementa al igual que incrementa la producción de biocrudo. En términos energéticos, la energía adicional que se requiere para la LHT (0.58 MJ) es compensada por la ganancia energética del biocrudo adicional que es producido (1.74 MJ). En este escenario, además de poder alcanzar una mayor eficiencia energética debido a la intensificación de los procesos; la recirculación de la fase acuosa permite un ahorro económico en términos de nutrientes y agua de proceso. Por cada metro cúbico de cultivo de algas que es producido, se ahorran 10 L de agua, 3.7 g de nitrógeno y 0.4 g de fósforo, lo que se traduce en un ahorro anual de 0.432 USD · m<sup>-3</sup> de cultivo de algas, considerando tiempos de cultivo de 15 días.

Al final, el tratamiento de la fase acuosa resultante de la LHT de algas permite la recirculación de una fracción de agua y nutrientes a los cultivos algales, mejorando la eficiencia energética global del proceso; mientras que la fracción restante puede ser descargado sin generar efectos ambientales o ser empleada como fertilizante de otro tipo de cultivos.

## 4.4 Conclusiones

Con el fin de evaluar la eficacia de la oxidación hidrotermal con peróxido para tratar la fase acuosa resultante de la LHT, diferentes diluciones de la fase acuosa tratada fueron testeadas en cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714. En los cultivos, se midió el efecto que la fase acuosa tratada tiene sobre el crecimiento de la microalga y los resultados se compraron con cultivos donde se empleó fase acuosa sin tratar y cultivos con medio de cultivo BBM. Se encontró que en general, la oxidación hidrotermal con peróxido permite la recirculación indiferente de la fase acuosa los cultivos de algas, debido a que, a todos los factores de dilución empleados, el crecimiento de la microalga fue como mínimo igual al del cultivo control en medio BBM. En fase acuosa sin tratar, la microalga es capaz de crecer a una velocidad menor que el cultivo control, después de tener un tiempo de adaptación tres veces mayor que en presencia de la fase acuosa tratada. Al comprar las diluciones empleadas, se encontró que a bajos factores de dilución los efectos

inhibitorios de los fenoles y de las altas concentraciones de amonio ocasionan una velocidad de crecimiento de la microalga menor que el control. En seguida, se determinó que 100x es el factor de dilución al cual se obtiene la mayor velocidad específica promedio de crecimiento ( $0.210 \text{ día}^{-1}$ ). A factores de dilución mayores, la velocidad específica de crecimiento decayó hasta alcanzar la obtenida para el cultivo control en medio BBM ( $0.173 \text{ día}^{-1}$ ), debido a la alta dilución del carbono orgánico total que la microalga es capaz de asimilar gracias a su capacidad mixotrófica de crecimiento. Al integrar los resultados obtenidos durante la LHT de la microalga, junto con el tratamiento de la fase acuosa y la recirculación de esta a los cultivos algales, se concluyó que, en términos energéticos, el tratamiento y recirculación de la fase acuosa permite obtener un beneficio energético de 0.55 MJ para el ciclo productivo de  $1 \text{ m}^3$  de cultivo de algas. La recirculación de fase acuosa a un factor de dilución de 100x mejora en un 23.6% el balance energético del sistema, en comparación con el sistema en el que el agua es tratada para ser descartada. En general, se tiene que el tratamiento de la fase acuosa es necesario por consideraciones medioambientales y que el tratamiento por oxidación hidrotermal con peróxido resulta beneficioso para la economía global del proceso al permitir la recirculación de agua y nutrientes, para al final mejorar la productividad de biocrudo de algas.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

En el presente trabajo, se evaluó el proceso de oxidación hidrotermal con peróxido (OHP) como alternativa de tratamiento de la fase acuosa resultante de la licuefacción hidrotermal (LHT) de microalgas. Para ello, el trabajo fue dividido en dos partes, precedidas del trabajo experimental necesario para obtener la fase de la LHT de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 2714. En esta parte, se obtuvo un buen rendimiento de biocrudo junto con una recuperación energética del 64.3%. Adicionalmente, la fase acuosa obtenida presentó una alta concentración de fósforo, nitrógeno y carbono, lo que valida el potencial de este subproducto como fuente de nutrientes para producir biomasa algal. Sin embargo, el contenido de compuestos fenólicos reafirma la necesidad de tratar el efluente debido al efecto tóxico e inhibitorio de estos sobre las microalgas.

La primera parte del trabajo consistió en establecer el tiempo de residencia y la relación molar de peróxido de la OHP que maximizaban la proporción de agua que podía ser recirculada a los cultivos de algas. Para ello, se evaluaron diferentes condiciones reactivas y se determinó el efecto combinado de las variables sobre la calidad de la fase acuosa tratada. Los resultados mostraron que, en términos generales, la relación molar de peróxido es la variable que más incide sobre la calidad final de agua. Se encontró que a mayores relaciones molares mayor era la remoción de carbono, nitrógeno, fósforo y fenoles. No obstante, al considerar el objetivo del tratamiento planteado, se formuló una optimización de variables en las que se buscaba minimizar la reducción de nutrientes mientras se maximizaba la remoción de compuestos tóxicos. Se obtuvo como resultado

que a bajos tiempos de reacción y empleando la relación estequiométrica de peróxido, se maximiza la cantidad de fase acuosa que puede ser valorizada. Se determinó que los parámetros de operación de la LHT que maximizan la remoción de compuestos fenólicos (89%) y minimizaban la remoción de fósforo y nitrógeno (40% y 30%, respectivamente) son 39 minutos de reacción y una relación molar de peróxido de 1.035.

Finalmente, en la segunda parte del trabajo se evaluó la eficacia del tratamiento hidrotermal al establecer el efecto de la dilución de la fase acuosa tratada sobre el crecimiento de la microalga *C. vulgaris*. Al comparar los resultados se encontró que, a diferencia de los cultivos en fase acuosa sin tratar, en medio de cultivo suplementado con fase acuosa tratada la microalga tuvo una mayor velocidad específica de crecimiento, en comparación a cultivos en medio estándar. El efecto del factor de dilución sobre la velocidad específica de crecimiento permitió establecer que a 100x se obtiene la máxima productividad de biomasa. Al integrar todos los resultados obtenidos, se concluyó que la OHP, además de ser un método efectivo para tratar la fase acuosa resultante de la LHT de algas, permite la recirculación de la fase acuosa, así como una mejora, en términos energéticos, del ciclo productivo de biocrudo obtenido a partir de algas.

## 5.2 Recomendaciones

El presente trabajo permitió valorizar la fase acuosa obtenida de la LHT de microalgas. Sin embargo, no se realizó ningún estudio sobre las demás fases resultantes de la LHT por lo que existen más oportunidades de investigación en este campo. Estos estudios permitirían integrar todas las corrientes y se podría integrar el concepto de biorrefinería para la producción de biocrudo a partir de algas.

En cuanto al tratamiento hidrotermal, se recomienda modificar el sistema de reacción con el fin de poder precalentar las fases reactivas, de forma independiente, y así, tener una mayor certitud sobre cuál es el efecto del tiempo de residencia en la calidad de la fase acuosa tratada. Igualmente, el estudio de más puntos experimentales permitiría una mejor optimización del proceso.

Finalmente, una caracterización más exhaustiva de las fases obtenidas de la LHT y de la OHP permitirían establecer balances elementales que permitirían realizar análisis de factibilidad ambiental y económica más robustos.

## **Anexos**

## Anexo A: Contenido de cenizas en biomasa

Las cenizas en la microalga constituyen todo el material inorgánico, que provienen de las sales residuales del medio de cultivo, que pueden estar libres o unidas a la estructura física de la biomasa y, que deben medirse como parte de su composición total. Este procedimiento está basado en el descrito por (Sluiter et al., 2008) y determina el contenido de cenizas en la microalga como el porcentaje del residuo que queda después de la oxidación a 575°C.

**Muestra:** microalga liofilizada a temperatura a 25°C y presión de 0,12 mbar durante 48 horas.

**Materiales y equipos:** Mufla ( $T_{\text{máx.}}$  600°C), balanza analítica, desecador de vidrio, tres cápsulas de porcelana, espátula, pinzas y equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio).

**Preparación del material:** Se pesan en una balanza analítica las tres capsulas de porcelana, se anota exactamente su peso. Se llevan las cápsulas vacías a la mufla y se calientan a 575°C por 4 horas, a una velocidad de calentamiento de 5°C/min, con el fin de eliminar cualquier material orgánico presentes en las capsulas. Una vez terminado el tiempo de calentamiento y enfriamiento (aproximadamente 20 horas), se retiran las cápsulas de la mufla con ayuda de unas pinzas y se introducen en un desecador. Se pesa y registrar nuevamente el peso de las cápsulas.

**Determinación de cenizas:** Una vez terminado el procedimiento anterior, se pesa en cada cápsula aproximadamente 0,5 g de microalga liofilizada, anotar el peso exacto (cápsula + microalga). Las cápsulas con la microalga se deben transportar hasta la mufla en un desecador. En ningún momento se deben tocar directamente con las manos, para ello se debe hacer uso de unas pinzas. Cuando las muestras se encuentren en la mufla calentar a 575°C por 4 horas, a una velocidad de calentamiento de 5°C/min. Terminado el tiempo de calentamiento y enfriamiento (aproximadamente 20 horas), se retirarán las cápsulas de la mufla con ayuda de las pinzas y se introducen en un desecador. Se pesa y registrar nuevamente el peso de las cápsulas más la muestra resultante.

**Cálculo del contenido de cenizas:** Para el cálculo del contenido de cenizas se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{W_2}{W_1 (100 - H)} \times 100$$

Donde:

$W_1$ : peso de la muestra de microalga antes de calentar a 575°C por 4 horas, en gramos

$W_2$ : peso de la muestra de microalga después de calentar a 575°C por 4 horas, en gramos

H: porcentaje de humedad de la microalga en gramos de agua/gramos de biomasa

Finalmente, se calcula el promedio, la desviación estándar y coeficiente de variación (%CV) para las tres muestras.

## Anexo B: Contenido de humedad en biomasa

La biomasa de microalgas contiene grandes cantidades de agua, que después de su cosecha y secado puede representar hasta un 30% de la biomasa y variar significativamente con cada muestra, por ello los resultados de la composición química de la biomasa se informan típicamente en base a su peso seco. Este procedimiento se basa en el descrito por (Sluiter et al., 2008) y determina el porcentaje de humedad en la microalga utilizando un analizador automático.

**Muestra:** microalga liofilizada a temperatura a 25°C y presión de 0,12 mbar durante 48 horas.

**Materiales y equipos:** balanza de humedad (AMB 50, Adam Equipment), espátula, equipo personal de seguridad (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas o máscara antigases).

**Determinación del contenido de humedad:** Se pesan en la balanza de humedad 0,2 g de microalga liofilizada, y se registra el peso exacto. Luego se programa la temperatura de la balanza a 105°C y se calienta la muestra hasta peso constante. Se anota el peso final de la muestra.

**Cálculo del contenido de humedad:** para el cálculo del contenido de humedad se debe seguir la siguiente formula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

Donde:

$W_1$ : peso de la muestra de microalga antes de calentar a 105°C

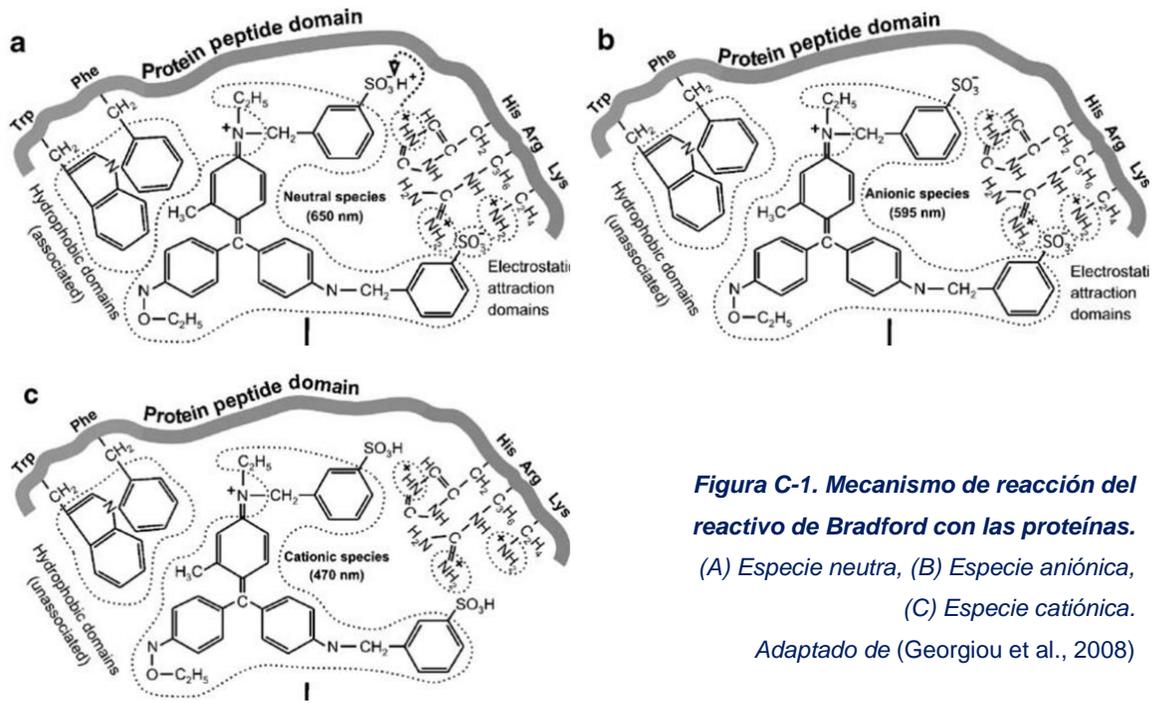
$W_2$ : peso de la muestra de microalga después de calentar a 105°C hasta peso constante

Finalmente, este procedimiento se realiza por triplicado y se calcula el promedio, la desviación estándar y coeficiente de variación para las tres muestras.

## Anexo C: Contenido de proteínas por el método de Bradford

### Fundamento

La metodología propuesta se basa en el método descrito por Bradford, (1976), que determina indirectamente el contenido de proteína soluble de una muestra, al formarse un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 con los anillos aromáticos de las proteínas, siendo la intensidad del color directamente proporcional al contenido de proteína. Esta metodología se basa en los resultados obtenidos por (Bio-Rad, 2006; Marion M. Bradford, 1976; Melgarejo, 2010).



**Figura C-1. Mecanismo de reacción del reactivo de Bradford con las proteínas.**  
 (A) Especie neutra, (B) Especie aniónica,  
 (C) Especie catiónica.  
 Adaptado de (Georgiou et al., 2008)

El reactivo de Bradford existe en tres formas según la carga de la molécula (Figura 1): aniónica (azul), neutral (verde), y catiónica (roja). **(a) Especie neutra (verde):** Se unen a las proteínas tanto por interacciones hidrófobas (a través de Phe, Trp, etc.) como por atracción electrostática entre el grupo sulfónico disociado distante del nitrógeno cuaternario y el grupo guanidino de Arg cargado positivamente (y secundariamente con Lys, His). Históricamente el pico de absorción de estas especies es a 650 nm. **(b) Especie aniónica (azul):** Se une a las proteínas principalmente por atracción electrostática entre el grupo sulfónico disociado distante del nitrógeno cuaternario y Arg (Lys, His), formando un complejo que absorbe a 595 nm y, por lo tanto, tiene propiedades espectrales similares a las de la especie neutra. **(c) Especie catiónica (roja):** No forma un complejo con proteínas porque su absorbancia a 470 nm no cambia, respecto a la del reactivo puro. Esto se espera porque ambos grupos sulfónicos de esta especie no están disponibles (protones neutralizados) para reaccionar con Arg, Lys o His.

## Materiales

Tubos de reacción tipo Eppendorf® de 2,0 mL

Juego de micropipetas de rangos de 10 a 100 µl y 100 a 1000 µl

Puntas para micropipetas de rangos de 10 a 100 µl y 100 a 1000 µl

Matraz aforado de 25 mL

Microplaca de 96 pozos

Espátula

Equipo de protección personal (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas o máscara antigases)

## Equipos

Espectrofotómetro Cytation 3 (BioTek®)

Balanza analítica AB204 (Mettler Toledo®)

Cabina de extracción

Agitador tipo vórtex SBS100 (Select Bioproducts®)

Ultrasonido Branson® Sonifier 450 digital, con cuerno de ½" de flujo interno con recirculación

Montaje de rompimiento celular (embudo, baño frío, mangueras de silicona, adaptadores)

Microcentrífuga Z-233 M-2 (Hermle®)

## Reactivos

Polvo de microalga *Chlorella vulgaris* liofilizada

Reactivo de Bradford (*Dye Reagent Concentrate, kit Bio-Rad® Protein Assay*)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Patrón de albúmina

## Preparación de soluciones

- 1. Patrón de calibración:** Pesar 0,130 g de albumina, disolver con 10 mL de agua destilada y luego aforar a 100 mL (albumina = 1,3 mg/mL).
- 2. Buffer de fosfato de sodio 0,02 M y pH 6:** Pesar 0,0344 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,2412 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en un vaso de precipitado, disolver con 80 mL de agua destilada agitando fuertemente, luego ajustar el pH a 6 (agregando gotas de una solución de NaOH o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, según se necesite) y aforar a 100 mL

## Curva de calibración

En un ensayo típico, en un tubo de reacción de 2.0 mL, se lleva a cabo la siguiente metodología por triplicado:

- a) Agregar el volumen de patrón de calibración y de buffer especificados en la Tabla 1, con ayuda de micropipeta.
- b) Agregar 100 µL del reactivo de Bradford y agitar fuertemente en un vórtex por un minuto.

El compuesto que se forma es estable máximo 1 hora. El blanco de los reactivos, el cual debe prepararse al mismo tiempo que la curva de calibración corresponde a las cantidades señaladas en el ítem marcado con la letra B de la Tabla C-1.

**Tabla C1. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración de proteínas.**

#	Patrón (µL)	Buffer (µL)	Reactivo Bradford (µL)
1	5	395	100
2	10	390	100
3	12	388	100
4	15	385	100
5	17	383	100
6	20	380	100
7	25	375	100
8	30	370	100
B	0,0	400	100

Para medir la absorbancia de cada muestra, se sigue los siguientes pasos:

- Medir la absorbancia a 595 nm de la caja vacía de 96 pozos a 25°C.
- Depositar 100 µL de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos incluido el blanco.
- Medir la absorbancia de las muestras a 595 nm a 25°C.
- Restar a las absorbancias de las muestras y el blanco, las absorbancias dadas por la caja vacía.
- Restar a las lecturas de absorbancias de las muestras, la lectura de absorbancia del blanco.

Así mismo, para calcular el contenido de glucosa en cada tubo de reacción se sigue la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$  = Concentración del patrón de albúmina en µg/µL.

$V_1$  = Volumen que se adicionó del patrón a cada tubo de reacción (Tabla C-1) en µL.

$V_2$  = Volumen total de reacción en µL (500 µL).

$C_2$  = Concentración final de albúmina en el tubo de reacción en µg/µL.

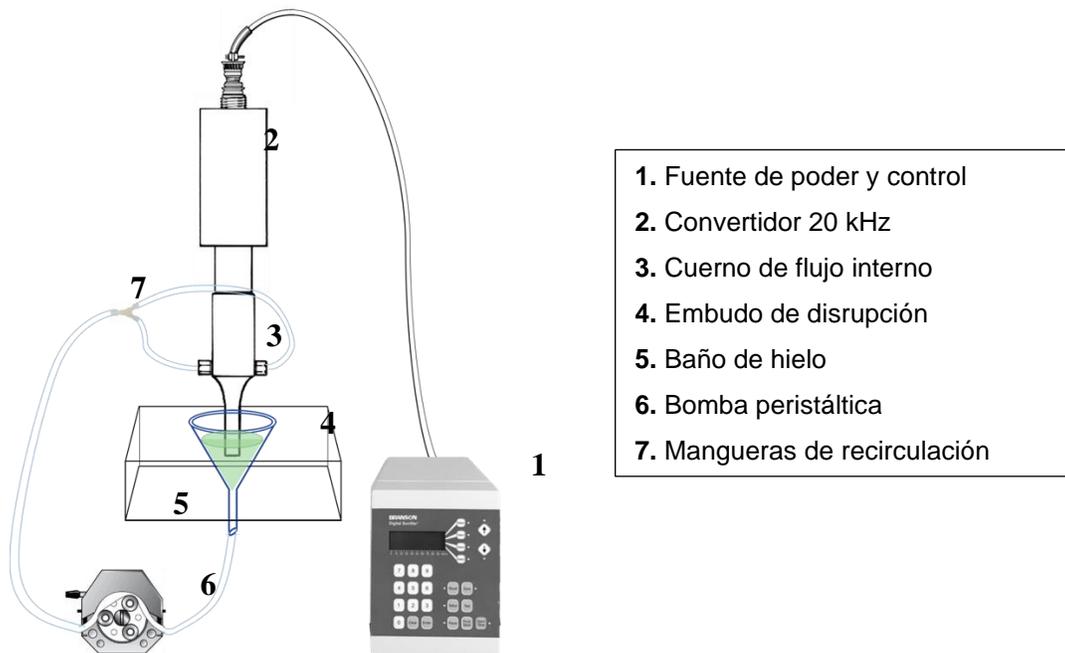
Finalmente, se elabora la gráfica: proteína total (mg/mL o µg/µL) vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual

a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica.

### **Rompimiento celular**

Para poder cuantificar el contenido de proteína se debe realizar la disrupción celular de las microalgas, por medio de ultrasonido, de la siguiente forma:

- a) Pesarse 0.1 g de la microalga liofilizada
- b) Disolver la biomasa algal en 100 mL del buffer de fosfatos
- c) Realizar el montaje para disrupción celular por ultrasonido presentado en la figura C-2.



**Figura C-2. Montaje para la disrupción celular de microalgas**

En el cubo de enfriamiento cargar agua con hielo hasta cubrir la mayor parte del embudo de rompimiento. Transferir al embudo de rompimiento, de forma analítica, la microalga disuelta en los solventes. Setear el flujo de la bomba peristáltica al 99% del máximo posible (flujo de trabajo = 24.5 mL/min). Establecer los siguientes parámetros en el equipo de ultrasonido:

Amplitud de ultrasonación: 60%  
Frecuencias de ultrasonación: 20 kHz  
Duración pulso encendido: 59 segundos  
Duración pulso apagado: 20 segundos

- d) Efectuar el rompimiento de la microalga durante 60 minutos, verificando siempre la ausencia de taponamientos en la manguera de silicona del montaje, y la presencia de hielo en el baño externo del embudo.
- e) Tomar muestra, por triplicado, del extracto obtenido y almacenar bajo refrigeración hasta análisis.
- f) Desmontar el equipo, realizar la correcta disposición de los residuos, lavar y juagar bien cada pieza del montaje.

### **Cuantificación de proteína algal**

- a) Centrifugar cada una de las muestras extraídas del rompimiento durante 5 minutos a 2400 x g.
- b) Transferir 400  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada tubo a tubos de reacción de 2 mL.
- c) Llevar a cabo el proceso descritos en la sección “**curva de calibración**” para la cuantificación de proteínas.
- d) Depositar 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos, incluido un blanco de reactivos.
- e) Medir la absorbancia de las muestras a 595 nm a 25°C.

El contenido de proteína de la microalga se determina a partir de la curva de calibración, elaborada previamente, por medio de la siguiente formula:

$$X = (Y - b) / m$$

Donde:

X = Concentración de proteína de la microalga,  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Y = Promedio de absorbancia de las muestras (restando el blanco) a 595 nm.

b = Intercepto de la curva de calibración.

m = Pendiente de la curva de calibración,  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ .

Dado el caso, que la absorbancia de las muestras estuviera fuera del rango de absorbancias de la curva de calibración, se debe realizar una dilución de las muestras empleando buffer de fosfatos, y este factor debe ser tenido en cuenta dentro del cálculo de la concentración total de proteína de la microalga. Finalmente, se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para la cuantificación realizada.

## Anexo D: Contenido de lípidos por el método de Sulfo-fosfo-vainillina

### Fundamento

El método Sulfo-fosfo-vainillina (SFV) determina indirectamente el contenido de lípidos totales, al formarse un compuesto de color rosa que tiene un máximo de absorción a 540 nm. Esta metodología es una adaptación del método propuesto por (Cheng et al., 2011). La metodología tradicional del método SFV presenta tres etapas (J. A. Knight et al., 1972).

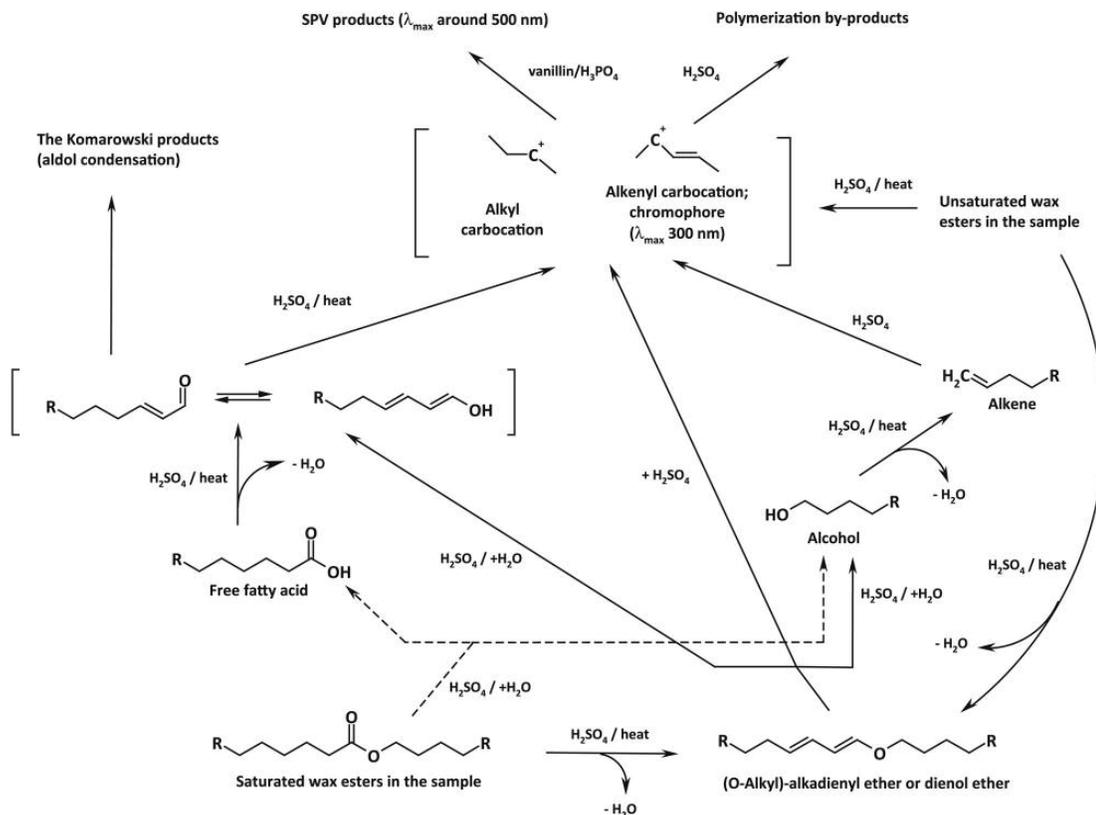


Figura D-1. Mecanismos de reacción del método SFV. Adaptado de (McMahon et al., 2013)

**(1) Formación de carbocationes:** En soluciones de ácido sulfúrico concentrado los lípidos forman carbocationes a través de dos mecanismos. El primero se basa en una reacción simple (reversible) de hidrólisis de ésteres en soluciones ácidas para producir un alcohol y un ácido graso libre, como se muestra en la Figura D-1. El segundo mecanismo implica la formación de vinil éter a través de la eliminación de una molécula de agua de un éster alifático.

**(2) Activación de la vainillina:** La vainillina es un aldehído poco reactivo. Para que pueda reaccionar con el carbocatión generado previamente, es necesario activarla por medio de una esterificación con ácido fosfórico que genera un éster fosfatado de vainilla, estabilizado por resonancia, que presenta un grupo carbonilo reactivo capaz de formar complejos con carbocationes.

**(3) Formación del complejo coloreado:** El carbocatión lipídico reacciona con el grupo carbonilo activado de la fosfo-vainillina para producir un complejo coloreado cargado, que se estabiliza por resonancia, y absorbe la mayor cantidad de luz a 540 nm.

## **Materiales**

Tubos de reacción tipo Eppendorf® de 2,0 mL

Juego de micropipetas de rangos de 10 a 100 µl y 100 a 1000 µl

Puntas para micropipetas de rangos de 10 a 100 µl y 100 a 1000 µl

Matraz aforado de 25 mL

Microplaca de 96 pozos

Hielo

Espátula

Equipo de protección personal (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas o máscara antigases)

## **Equipos**

Espectrofotómetro Cytation 3 (BioTek®)

Balanza analítica AB204 (Mettler Toledo®)

Cabina de extracción

Agitador tipo vórtex SBS100 (Select Bioproducts®)

Horno INC 116-001 (Memmert®)

Ultrasonido Branson® Sonifier 450 digital, con cuerno de ½" de flujo interno con recirculación

Montaje de rompimiento celular (embudo, baño frío, mangueras de silicona, adaptadores)

Microcentrífuga Z-233 M-2 (Hermle®)

### **Reactivos**

Polvo de microalga *Chlorella vulgaris* liofilizada

Ácido sulfúrico concentrado, 97% (PanReac®)

Ácido fosfórico al 17% v/v (PanReac®)

Vainillina (99%, Merck)

Aceite de canola (comercial)

Cloroformo (PanReac®)

Metanol (PanReac®)

### **Preparación de soluciones**

- 1. Solvente:** Mezclar por partes iguales cloroformo y metanol. Almacenar en nevera en un frasco hermético
- 2. Patrón de calibración:** pesar 0,015 g de aceite, en un matraz de 10 mL y aforar con la mezcla de solventes (Concentración de aceite= 1,5 mg/mL).
- 3. Reactivo ácido fosfórico – vainillina:** Pesar 0,2 mg de vainillina por cada mL de ácido fosfórico al 17%. Por ejemplo, para 250 mL de ácido fosfórico agregar 50 mg de vainillina, disolver y almacenar en un frasco ámbar.

### **Curva de calibración**

En un ensayo típico, en un tubo de reacción de 2.0 mL, se lleva a cabo la siguiente metodología por triplicado:

- a) Agregar el volumen de patrón de calibración especificado en la Tabla D-1, con ayuda de micropipeta.
- b) En una cabina de extracción y con el equipo de protección personal, agregar 300  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico concentrado y, agitar fuertemente en un vórtex durante 60 segundos.
- c) Calentar los tubos a  $90^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, para evaporar los solventes y propiciar la reacción de hidrólisis.
- d) Enfriar rápidamente en un baño de hielo.
- e) Agregar 500  $\mu\text{L}$  del reactivo ácido fosfórico-vainillina y agitar fuertemente en un vórtex entre 30 y 60 segundos.

El blanco de los reactivos se realiza para cada punto descrito en la Tabla D-1, partiendo de las mismas cantidades, reemplazando el patrón por volúmenes equivalentes de la mezcla cloroformo:metanol sin el aceite. Se debe tener en cuenta que el compuesto de color que se forma es estable solo por 1 hora.

**Tabla D-1. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración de lípidos**

#	Patrón ( $\mu\text{L}$ )	$\text{H}_2\text{SO}_4$ ( $\mu\text{L}$ )	$\text{H}_3\text{PO}_4$ – Vainillina ( $\mu\text{L}$ )
1	10	300	500
2	20	300	500
3	30	300	500
4	40	300	500
5	50	300	500
6	60	300	500

Para medir la absorbancia de cada muestra, se sigue los siguientes pasos:

- a) Medir la absorbancia a 540 nm de la caja vacía de 96 pozos a  $25^{\circ}\text{C}$ .
- b) Depositar 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos incluido el blanco.
- c) Medir la absorbancia de las muestras a 540 nm a  $25^{\circ}\text{C}$ .
- d) Restar a las absorbancias de las muestras y el blanco, las absorbancias dadas por la caja vacía.
- e) Restar a las lecturas de absorbancias de las muestras, la lectura de absorbancia del blanco correspondiente.

Así mismo, para calcular el contenido de lípidos en cada tubo de reacción se sigue la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$  = Concentración del patrón de lípidos en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

$V_1$  = Volumen que se adicionó del patrón a cada tubo de reacción (Tabla 1) en  $\mu\text{L}$ .

$V_2$  = Volumen total de reacción en  $\mu\text{L}$ . Que equivale a 800  $\mu\text{L}$  (Debido a que los solventes se evaporaron)

$C_2$  = Concentración final de lípidos en el tubo de reacción en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Finalmente, se elabora la gráfica: lípidos totales (mg/mL o  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica.

### **Rompimiento celular**

Para poder cuantificar el contenido de lípidos se debe realizar la disrupción celular de las microalgas, por medio de ultrasonido, de la siguiente forma:

- a) Pesar 0.1 g de la microalga liofilizada
- b) Disolver la biomasa algal en 100 mL de la mezcla de solventes para cuantificación de lípidos (metanol:cloroformo 1:1)
- c) Realizar el montaje para disrupción celular por ultrasonido presentado en la figura D-2.

En el cubo de enfriamiento cargar agua con hielo hasta cubrir la mayor parte del embudo de rompimiento. Transferir al embudo de rompimiento, de forma analítica, la microalga disuelta en los solventes. Setear el flujo de la bomba peristáltica al 99% del

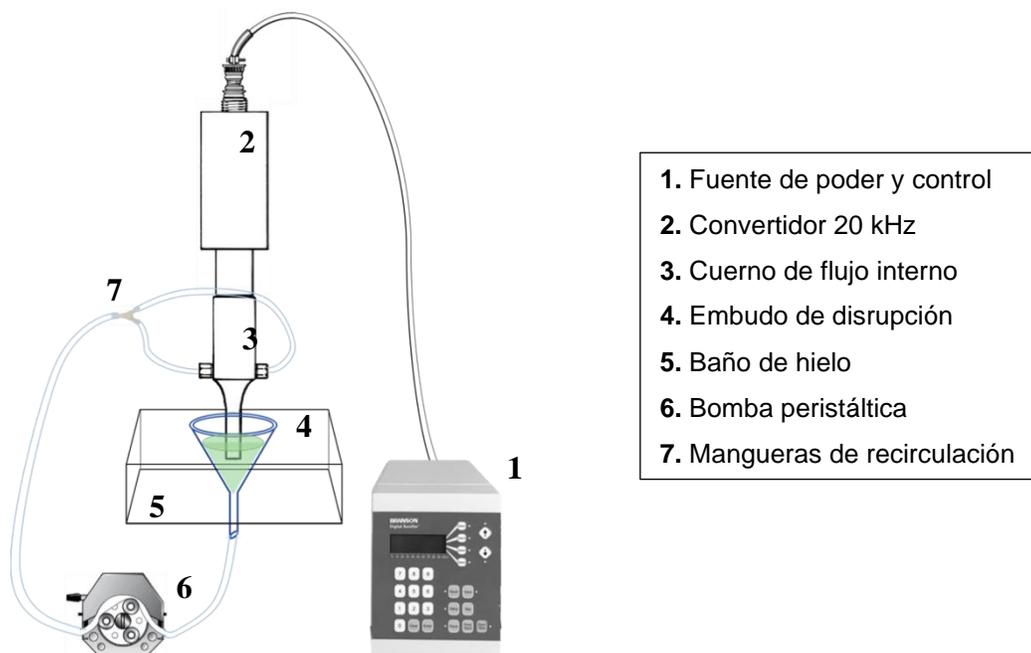
máximo posible (flujo de trabajo = 24.5 mL/min). Establecer los siguientes parámetros en el equipo de ultrasonido:

Amplitud de ultrasonación: 60%

Frecuencias de ultrasonación: 20 kHz

Duración pulso encendido: 59 segundos

Duración pulso apagado: 20 segundos



**Figura D-2. Montaje para la disrupción celular de microalgas**

- d) Efectuar el rompimiento de la microalga durante 60 minutos, verificando siempre la ausencia de taponamientos en la manguera de silicona del montaje, y la presencia de hielo en el baño externo del embudo.
- e) Tomar muestra, por triplicado, del extracto obtenido y almacenar bajo refrigeración hasta análisis.
- f) Desmontar el equipo, realizar la correcta disposición de los residuos, lavar y juagar bien cada pieza del montaje.

### **Cuantificación de lípidos algales**

- a) Centrifugar cada una de las muestras extraídas del rompimiento durante 5 minutos a 2400 x g, empleando una microcentrífuga.
- b) Transferir 60 µL del sobrenadante de cada tubo a tubos de reacción de 2 mL.
- c) Llevar a cabo el proceso descritos en la sección “**curva de calibración**” para la cuantificación de lípidos.
- d) Depositar 100 µL de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos, incluido un blanco de reactivos.
- e) Medir la absorbancia de las muestras a 540 nm a 25°C.

El contenido de lípidos de la microalga se determina a partir de la curva de calibración, elaborada previamente, por medio de la siguiente formula:

$$X = (Y - b)/m$$

Donde:

X = Concentración de lípidos de la microalga, µg/µL.

Y = Promedio de absorbancia de las muestras (restando el blanco) a 540 nm.

b = Intercepto de la curva de calibración.

m = Pendiente de la curva de calibración, µL/µg.

Dado el caso, que la absorbancia de las muestras estuviera fuera del rango de absorbancias de la curva de calibración, se debe realizar una dilución de las muestras empleando cloroformo:metanol 1:1, y este factor debe ser tenido en cuenta dentro del cálculo de la concentración total de lípidos de la microalga. Finalmente, se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para la cuantificación realizada.

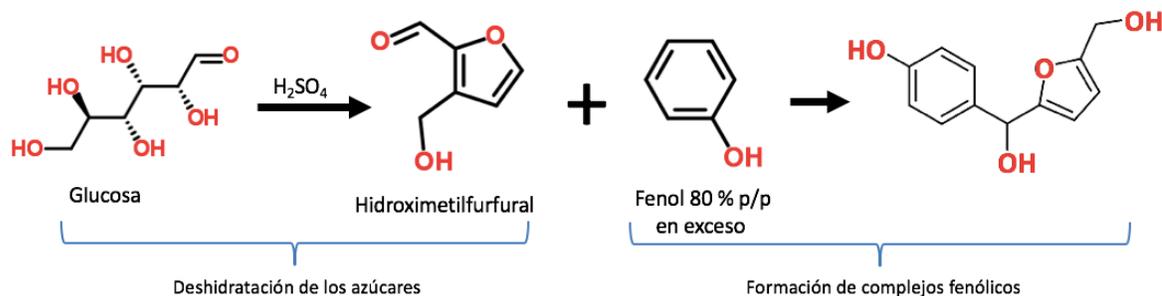
## Anexo E: Contenido de carbohidratos por el método de Dubois

### Fundamento

El método fenol-sulfúrico descrito por (Dubois et al., 1956), que determina indirectamente el contenido de carbohidratos totales, se ha utilizado ampliamente en la caracterización de microalgas. Esta metodología se basa en los resultados obtenidos por (Dubois et al., 1956; Melgarejo, 2010).

El método detecta virtualmente todas las clases de carbohidratos, incluidos los mono, di, oligo y polisacáridos. Aunque el método detecta casi todos los carbohidratos, la capacidad de absorción de los diferentes carbohidratos varía. Por lo tanto, a menos que se sepa que una muestra contiene solo un carbohidrato, los resultados deben expresarse en términos de un carbohidrato de referencia (Nielsen, 2017).

En este método (Figura E-1), el ácido sulfúrico concentrado descompone los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos en monosacáridos. Las pentosas (compuestos de 5 carbonos) luego se deshidratan a furfural y las hexosas (compuestos de 6 carbonos) a hidroximetil furfural. Estos compuestos se condensan con ellos mismos o compuestos fenólicos para producir complejos de color oscuro. El complejo desarrollado absorbe la luz, y la absorbancia es proporcional a la concentración de azúcar de una manera lineal. Se observa un máximo de absorbancia a 490 nm para las hexosas y 480 nm para las pentosas y los ácidos urónicos medidos por un espectrofotómetro UV-VIS (Cui & Brummer, 2010).



**Figura E-1. Mecanismo de reacción del método fenol-sulfúrico para la glucosa**

## Materiales

Tubos de reacción tipo Eppendorf® de 2,0 mL

Juego de micropipetas de rangos de 10 a 100 µl y 100 a 1000 µl

Puntas para micropipetas de rangos de 10 a 100 µl y 100 a 1000 µl

Matraz aforado de 25 mL

Microplaca de 96 pozos

Espátula

Equipo de protección personal (guantes, gafas, bata de laboratorio, tapa bocas o máscara antigases)

## Equipos

Espectrofotómetro Cytation 3 (BioTek®)

Balanza analítica AB204 (Mettler Toledo®)

Cabina de extracción

Agitador tipo vórtex SBS100 (Select Bioproducts®)

Ultrasonido Branson® Sonifier 450 digital, con cuerno de ½" de flujo interno con recirculación

Montaje de rompimiento celular (embudo, baño frío, mangueras de silicona, adaptadores)

Microcentrífuga Z-233 M-2 (Hermle®)

## Reactivos

Polvo de microalga *Chlorella vulgaris* liofilizada

Ácido sulfúrico concentrado, 98% (PanReac®)

Fenol (Baker®)

D-glucosa (Panreac®).

### Preparación de soluciones

1. **Patrón de calibración:** Pesar 0,100 g de D-glucosa, disolver con 10 mL de agua destilada y luego aforar a 100 mL (glucosa = 1,0 mg/mL).
2. **Solución de fenol al 80 % p/p:** Pesar 8,0 g de fenol en un frasco ámbar y agregar 2,0 g con agua destilada. Disolver el fenol agitando fuertemente.

### Curva de calibración

En un ensayo típico, en un tubo de reacción de 2.0 mL, se lleva a cabo la siguiente metodología por triplicado:

- a) Agregar el volumen de patrón de calibración y de agua destilada especificados en la Tabla E-1, con ayuda de micropipeta.
- b) En una cabina de extracción y con el equipo de protección personal, agregar 100  $\mu$ L de la solución de fenol al 80% y, agitar fuertemente en un vórtex durante 60 segundos.
- c) Adicionar 500  $\mu$ L de ácido sulfúrico concentrado y, agitar nuevamente en un vórtex durante 60 segundos.
- d) Dejar enfriar a temperatura ambiente y en completa oscuridad.

**Tabla E-1. Mezclas de reacción para la elaboración para la elaboración de la curva de calibración**

#	Agua destilada ( $\mu$ L)	Patrón ( $\mu$ L)	Fenol ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ( $\mu$ L)
1	100	5	100	500
2	95	10	100	500
3	90	15	100	500
4	85	20	100	500
5	80	25	100	500
6	75	30	100	500
7	70	35	100	500
8	65	40	100	500
9	60	45	100	500
B	105	0,0	100	500

El compuesto que se forma es estable por 36 horas. El blanco de los reactivos, el cual debe prepararse al mismo tiempo que la curva de calibración corresponde a las cantidades señaladas en el ítem marcado con la letra B de la Tabla E-1.

Para medir la absorbancia de cada muestra, se sigue los siguientes pasos:

- a) Medir la absorbancia a 485 nm de la caja vacía de 96 pozos a 25°C.
- b) Depositar 100 µL de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos incluido el blanco.
- c) Medir la absorbancia a 485 nm a 25°C.
- d) Restar a las absorbancias de las muestras y el blanco, las absorbancias dadas por la caja vacía.
- e) Restar a las lecturas de absorbancias de las muestras, la lectura de absorbancia del blanco.

Así mismo, para calcular el contenido de glucosa en cada tubo de reacción se sigue la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$  = Concentración del patrón de glucosa en µg/µL.

$V_1$  = Volumen que se adiciono del patrón a cada tubo de reacción (Tabla E-1) en µL.

$V_2$  = Volumen total de reacción en µL (705 µL).

$C_2$  = Concentración final de glucosa en el tubo de reacción en µg/µL.

Finalmente, se elabora la gráfica: Carbohidratos totales (mg/mL o µg/µL) vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica.

### **Rompimiento celular**

Para poder cuantificar el contenido de proteína se debe realizar la disrupción celular de las microalgas, por medio de ultrasonido, de la siguiente forma:

- a) Pesar 0.1 g de la microalga liofilizada.
- b) Disolver la biomasa algal en 100 mL de agua destilada.
- c) Realizar el montaje para disrupción celular por ultrasonido presentado en la figura E-2.

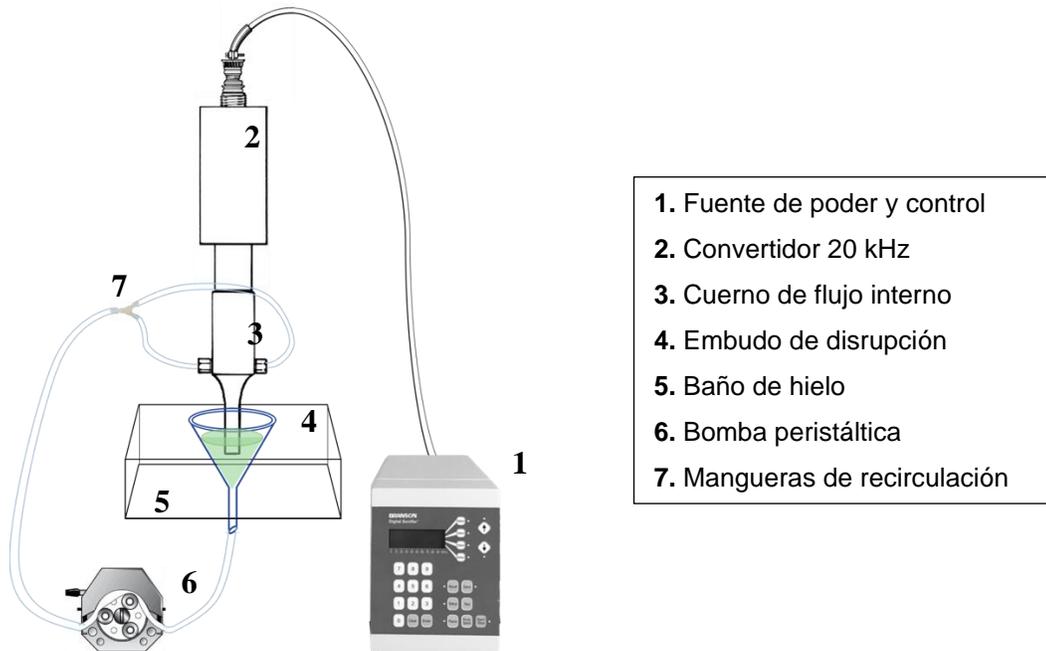
En el cubo de enfriamiento cargar agua con hielo hasta cubrir la mayor parte del embudo de rompimiento. Transferir al embudo de rompimiento, de forma analítica, la microalga disuelta en los solventes. Setear el flujo de la bomba peristáltica al 99% del máximo posible (flujo de trabajo = 24.5 mL/min). Establecer los siguientes parámetros en el equipo de ultrasonido:

Amplitud de ultrasonación: 60%

Frecuencias de ultrasonación: 20 kHz

Duración pulso encendido: 59 segundos

Duración pulso apagado: 20 segundos



**Figura E-2. Montaje para la disrupción celular de microalgas**

- d) Efectuar el rompimiento de la microalga durante 60 minutos, verificando siempre la ausencia de taponamientos en la manguera de silicona del montaje, y la presencia de hielo en el baño externo del embudo.

- e) Tomar muestra, por triplicado, del extracto obtenido y almacenar bajo refrigeración hasta análisis.
- f) Desmontar el equipo, realizar la correcta disposición de los residuos, lavar y juagar bien cada pieza del montaje.

### **Cuantificación de carbohidratos algales**

- a) Centrifugar cada una de las muestras extraídas del rompimiento durante 5 minutos a 2400 x g.
- b) Transferir 105  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada tubo a tubos de reacción de 2 mL.
- c) Llevar a cabo el proceso descritos en la sección “**curva de calibración**” para la cuantificación de carbohidratos.
- d) Depositar 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos, incluido un blanco de reactivos.
- e) Medir la absorbancia de las muestras a 485 nm a 25°C.

El contenido de carbohidratos de la microalga se determina a partir de la curva de calibración, elaborada previamente, por medio de la siguiente formula:

$$X = (Y - b)/m$$

Donde:

X = Concentración de carbohidratos de la microalga,  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Y = Promedio de absorbancia de las muestras (restando el blanco) a 485 nm.

b = Intercepto de la curva de calibración.

m = Pendiente de la curva de calibración,  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ .

Dado el caso, que la absorbancia de las muestras estuviera fuera del rango de absorbancias de la curva de calibración, se debe realizar una dilución de las muestras empleando agua destilada, y este factor debe ser tenido en cuenta dentro del cálculo de la concentración total de proteína de la microalga. Finalmente, se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para la cuantificación realizada.

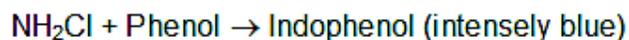
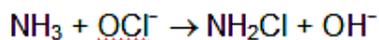
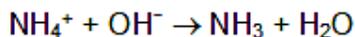
## Anexo F: Contenido de amonio por el método Azul indofenol

### Fundamento

Nitrogeno, en la forma de  $\text{NH}_3$  (gaseoso) o  $\text{NH}_4^+$  (forma iónica), es el primer producto de descomposición de la materia orgánica que contiene nitrógeno. Un método colorimétrico sensible para determinar amonio en agua no fue desarrollado sino hasta 1969. Antes de ese momento, las muestras debían destilarse antes del análisis. El método presentado aquí, es adecuado tanto para agua de mar como agua dulce.

El método emplea la reacción 'azul indofenol' entre amoníaco, fenol e hipoclorito en un medio alcalino. El Indofenol es un derivado de amino intensamente coloreado de fenilquinona-monoamina.

El color azul resultante es similar al de los colorantes de indofenol y su intensidad es proporcional a la concentración de amonio. La reacción colorimétrica del indofenol se modificó mediante la introducción del catalizador nitroprusiato que acentúa el color azul a temperatura ambiente.



## **Materiales**

Balones aforados de 100 mL  
Erlenmeyer de 250 mL  
Espectrofotómetro Cytation 3 ®  
Balanza analítica  
Micropipetas de 100 y 1000 µL  
Cajas de 96 pozos  
Vórtex  
Cabina de extracción

## **Reactivos**

Fenol cristal  
Nitroprusiato de sodio  
Hipoclorito de sodio  
Citrato de sodio  
Agua desionizada  
Cloruro de amonio

## **Preparación de soluciones**

- 1. Solución de fenol:** En una cabina de extracción, disolver 20 g de fenol cristal grado analítico en 100 mL de etanol al 95% v/v, haciendo uso de un balón aforado. Esta solución es estable por al menos 6 meses, y debe ser conservada en un frasco ambar a temperatura ambiente.
- 2. Solución de nitroprusiato de sodio:** Se prepara disolviendo 0,5 gramos de nitroprusiato en 100 mL de agua desionizada, usando un balón aforado. La solución es estable por al menos un mes, si se almacena en un frasco ambar.  
**Precaución:** El nitroprusiato es sensible a la luz, debe estar almacenado en un frasco ambar, preferiblemente en un desecador. Evitar su inhalación, es tóxico.

3. **Solución alcalina:** Se prepara disolviendo 20 gramos de citrato de sodio y 1 gramo de hidróxido de sodio (grado analítico) en 100 mL de agua desionizada, empleando un balón aforado. La solución es estable indefinidamente una vez almacenada. Se debe tener precaución al manejar el hidróxido de sodio.
4. **Solución oxidante:** Mezclar 20 mL de la solución alcalina con 5 mL de solución de hipoclorito de sodio comercial (concentración 5.25% sin aditivos). Esta solución debe ser fresca, debe prepararse cada vez que se desee realizar el ensayo y es estable máximo un día si es bien almacenada.
5. **Solución estándar de amonio:** Secar 5 gramos de cloruro de amonio en un horno a 60°C por 24 horas. Una vez frío (en un desecador), adicionar 0.3820 g de cloruro de amonio a 100 mL de agua desionizada en un matraz aforado. Agregar 0.1 mL de cloroformo para preservar. Esta solución es 0.07 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (714  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  o 1.000 ppm  $\text{NH}_4\text{-N}$ ). La solución es estable por varios meses si es bien almacenada.

### Curva de calibración

En un ensayo típico se agrega en un tubo de reacción de 2,0 mL, 1000  $\mu\text{L}$  de soluciones de diferentes concentraciones, preparadas a partir de la solución patrón, con ayuda de una micropipeta. Posteriormente agregar 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de fenol y, agitar fuertemente en un vórtex entre 30 y 60 segundos. Luego, adicionar 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de nitroprusiato de sodio y volver a agitar en vórtex. Finalmente adicionar 100  $\mu\text{L}$  de la solución oxidante, agitar y dejar incubar la reacción por 1 hora, en oscuridad, a una temperatura entre 20 y 27°C. El compuesto que se forma es estable, pero sigue desarrollando color en el tiempo. Realizar por triplicado cada ensayo (Tabla F-1)

Para medir la absorbancia de cada muestra, se sigue los siguientes pasos:

- a) Medir la absorbancia a 640 nm de la caja vacía de 96 pozos a 25°C.
- b) Depositar 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos, incluido el blanco.
- c) Medir la absorbancia a 640 nm a 25°C en el Cytation 3 (BioTek®)
- d) Restar a las absorbancias de las muestras y el blanco, las absorbancias correspondientes de cada pozo en la caja vacía.

- e) Restar a las lecturas de absorbancia de las muestras, la lectura promedio de absorbancia del blanco.

*Tabla F-1. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración*

#	Agua ( $\mu\text{L}$ )	Patrón ( $\mu\text{L}$ )	Fenol ( $\mu\text{L}$ )	Nitroprusiato ( $\mu\text{L}$ )	Solución oxidante ( $\mu\text{L}$ )
<b>B</b>	1000	0	40	40	100
<b>1</b>	980	20	40	40	100
<b>2</b>	960	40	40	40	100
<b>3</b>	940	60	40	40	100
<b>4</b>	920	80	40	40	100
<b>5</b>	900	100	40	40	100
<b>6</b>	880	120	40	40	100
<b>7</b>	860	140	40	40	100

Así mismo, para calcular el contenido de fósforo en cada tubo de reacción se sigue la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$  = concentración de fósforo en el patrón mg/L.

$V_1$  = Volumen que se adicionó del patrón a cada tubo de reacción en  $\mu\text{L}$ .

$C_2$  = Volumen total de reacción en  $\mu\text{L}$ .

$V_2$  = Concentración final de fósforo en el tubo de reacción en mg/L.

Finalmente, se elabora la gráfica: Amonio ( $\text{mg NH}_4\text{-N/L}$ ) vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica.

## Anexo G: Contenido de nitratos por absorbancia UV

### Fundamento

La técnica de monitoreo espectrofotométrico ultravioleta (UV) mide la absorbancia del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a 220 nm y es adecuada para la determinación rápida de  $\text{NO}_3^-$  y el monitoreo de aguas con bajo contenido de materia orgánica, como aguas naturales sin contaminar y fuentes de agua potable.

Debido a que la materia orgánica disuelta también puede absorber a 220 nm y a que el  $\text{NO}_3^-$  no absorbe a 275 nm, se usa una segunda medición a 275 nm para corregir el valor de  $\text{NO}_3^-$ . La aplicación de esta corrección empírica está relacionada con la naturaleza y concentración de materia orgánica y puede variar de una muestra a otra (APHA, 1999).

### Materiales

Balones aforados de 100 y 1000 mL

Espectrofotómetro Cytation 3®

Balanza analítica

Micropipetas de 100 y 1000  $\mu\text{L}$

Cajas de 96 pozos para absorbancia UV

## Reactivos

Nitrato de potasio

### Preparación de soluciones

- Solución patrón de nitrato:** Secar nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) al 99% o mayor, en un horno a  $105^\circ\text{C}$  por 24 h. Disolver 0,1805 g en agua desionizada y diluir a 250 mL ( $100 \mu\text{g NO}_3\text{-N/L}$ ). Diluir 10 mL en 90 mL de agua desionizada para obtener una solución  $10 \mu\text{g NO}_3\text{-N/L}$ .

### Curva de calibración

En un ensayo típico se agrega en un tubo de reacción de 2,0 mL, 1000  $\mu\text{L}$  de soluciones de diferentes concentraciones, preparadas a partir de la solución patrón, con ayuda de una micropipeta (Tabla H-1).

**Tabla H-1. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración**

#	Patrón ( $\mu\text{L}$ )	Agua ( $\mu\text{L}$ )
1	1000	0
2	800	200
3	600	400
4	400	600
5	200	800
6	150	850
7	100	900
8	50	950
B	0	1000

Para medir la absorbancia de cada muestra, se sigue los siguientes pasos:

- Medir la absorbancia a 220 y 275 nm de la caja vacía de 96 pozos a  $25^\circ\text{C}$ .
- Depositar 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos, incluido el blanco.
- Medir la absorbancia a 220 y 275 nm a  $25^\circ\text{C}$  en el Cytation 3 (BioTek®)
- A cada valor de absorbancia obtenido a 220 restar dos veces el valor de absorbancia obtenido a 275 nm (realizar esto con las muestras y caja vacía).

- e) Restar de las absorbancias de las muestras y el blanco, el resultado correspondiente de cada pozo en la caja vacía.
- f) Restar a las lecturas de absorbancia de las muestras, la lectura promedio de absorbancia del blanco.

Así mismo, para calcular el contenido de nitrato en cada tubo de reacción se sigue la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$  = concentración de nitrato en el patrón mg/L.

$V_1$  = Volumen que se adicionó del patrón a cada tubo de reacción en  $\mu\text{L}$ .

$C_2$  = Volumen total de reacción en  $\mu\text{L}$ .

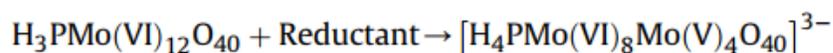
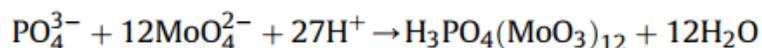
$V_2$  = Concentración final de nitrato en el tubo de reacción en mg/L.

Finalmente, se elabora la gráfica: Nitratos ( $\text{mg NO}_3\text{-N/L}$ ) vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica.

## Anexo H: Contenido de fosfatos solubles por el método Azul de molibdeno

### Fundamento

El método se basa en la reacción del ion fosfato con molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) que da lugar a fosfomolibdato ( $[\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3]^{3-}$ ). Este último por reducción origina un compuesto cuya estructura exacta se desconoce, denominado “azul de molibdeno”. Como reductores se pueden utilizar muchos compuestos, de los cuales el sulfhidrato de hidrazina, el cloruro estano y el ácido ascórbico son los más empleados (APHA, 1999; Lasso, 2007).



### Materiales

Balones aforados de 100 y 1000 mL

Erlenmeyer de 250 mL

Espectrofotómetro Cytation 3 ®

Balanza analítica

Micropipetas de 100 y 1000 µL

Cajas de 96 pozos

Plancha de calentamiento

Cabina de extracción

## Reactivos

Molibdato de amonio

Ácido sulfúrico concentrado

Cloruro estanoso dihidratado

Glicerol

Fosfato ácido de potasio o sodio

## Preparación de soluciones

- 2. Solución de molibdato de amonio:** Se prepara mediante mezcla de dos soluciones previas. Primero, se disuelven 25 g de molibdato amónico en unos 175 ml de agua destilada. En otro frasco, se añaden 280 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado en 400 mL de agua destilada (se debe dejar enfriar la solución). Una vez se tienen las dos soluciones, la solución de molibdato se añade sobre la de ácido sulfúrico, y se afora a 1L con agua destilada. La solución es estable si se mantiene en frasco cerrado.
- 3. Solución reductora:** Se prepara disolviendo 2,5 g de cloruro estanoso dihidratado en 100 ml de glicerol, empleando un baño maría y agitando con una varilla de vidrio. La solución es estable y no requiere almacenamiento especial.
- 4. Solución patrón de fósforo de 0,5 ppm:** Se prepara disolviendo la cantidad adecuada de sal (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, o K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) en agua destilada, añadiendo 2 ml de HCl concentrado y diluyendo a 1 L con agua destilada.

*Ejemplo:* Pesar 21,95 mg de fosfato monobásico de potasio anhidro previamente secado a 105°C durante 2 horas, y aforar con agua destilada a 100 mL. Tomar una alícuota de 10 mL y volver a aforar hasta 100 mL con agua destilada.

### Curva de calibración

En un ensayo típico se agrega en un tubo de reacción de 2,0 mL, 1000 µL de soluciones de diferentes concentraciones, preparadas a partir de la solución patrón, con ayuda de una micropipeta. Posteriormente agregar 40 µL del reactivo de molibdato de amonio y, agitar fuertemente en un vórtex entre 30 y 60 segundos. Luego, adicionar 5 µL del reactivo de cloruro de estaño y volver a agitar en vórtex. Dejar incubar la reacción por 10 minutos, a temperatura ambiente. El compuesto que se forma es estable por 20 minutos. Realizar por triplicado cada ensayo (Tabla H-1)

**Tabla H-1. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración**

#	Patrón (µL)	Agua (µL)	Molibdato (µL)	SnCl <sub>2</sub> (µL)
1	1000	0	40	5
2	800	200	40	5
3	600	400	40	5
4	400	600	40	5
5	200	800	40	5
6	150	850	40	5
7	100	900	40	5
8	50	950	40	5
B	0	1000	40	5

Para medir la absorbancia de cada muestra, se sigue los siguientes pasos:

- g) Medir la absorbancia a 690 nm de la caja vacía de 96 pozos a 25°C.
- h) Depositar 100 µL de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos, incluido el blanco.
- i) Medir la absorbancia a 690 nm a 25°C en el Cytation 3 (BioTek®)
- j) Restar a las absorbancias de las muestras y el blanco, las absorbancias correspondientes de cada pozo en la caja vacía.
- k) Restar a las lecturas de absorbancia de las muestras, la lectura promedio de absorbancia del blanco.

Así mismo, para calcular el contenido de fósforo en cada tubo de reacción se sigue la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$  = concentración de fósforo en el patrón mg/L.

$V_1$  = Volumen que se adicionó del patrón a cada tubo de reacción en  $\mu\text{L}$ .

$C_2$  = Volumen total de reacción en  $\mu\text{L}$ .

$V_2$  = Concentración final de fósforo en el tubo de reacción en mg/L.

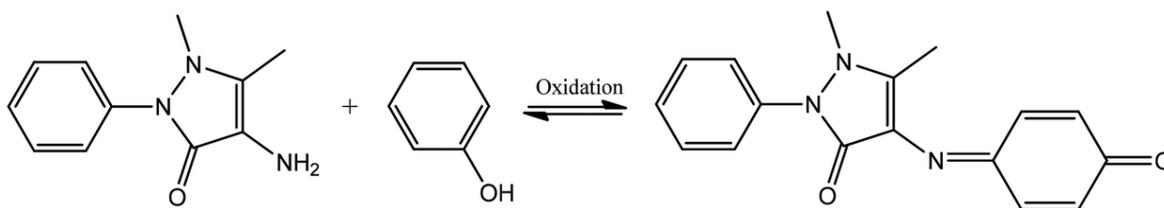
Finalmente, se elabora la gráfica: Fosfatos solubles (mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$ ) vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica.

## Anexo I: Contenido de fenoles por el método de 4-aminoantipirina

### Fundamento

Los fenoles, definidos como hidroxiderivados del benceno y sus núcleos condensados, pueden aparecer en las aguas residuales domésticas e industriales, en las aguas naturales y en los suministros de agua potable. La cloración de tales aguas puede producir clorofenoles olorosos y que producen mal sabor. Los procesos de extracción del fenol en el tratamiento del agua incluyen la supercloración, tratamiento con dióxido de cloro o cloramina, la ozonización y adsorción con carbón activo.

El presente procedimiento analítico utiliza el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina que determina fenol y compuestos fenólicos mayores, al formar un compuesto coloreado marrón-rojizo de antipirina a pH básico, que es estable y susceptible de determinación espectrofotométrica a 510 nm. La cantidad de color producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos (APHA, 1999; Dannis, 1951; EPA, 1978; L.S. Clesceri, A.R. Greenberg, 2010).



**Figura I-1. Reacción entre fenol y 4-aminoantipirina, catalizada por ferricianuro de potasio en condiciones alcalinas (pH 7.5 – 10.5)**

## **Sensibilidad**

El método colorimétrico de la 4-aminoantipirina es muy sensible, y está particularmente bien adaptado para contenidos entre 0.1 y 5 ppm de fenol.

El método es capaz de determinar fenol, fenoles sustituidos en orto y meta y, bajo condiciones apropiadas de pH, los fenoles sustituidos en para en los que los sustituyentes son grupos carboxilo, halógeno, metoxilo ácido sulfónico. El método no determina los fenoles para-sustituidos donde la sustitución es un grupo alquilo, arilo, nitro, benzoilo, nitroso o aldehído.

## **Interferencias**

Compuestos altamente oxidantes como hipoclorito y otros que causan la liberación de yodo, al agregar yoduro de potasio a la mezcla en condiciones ácidas, oxidan parcialmente los compuestos fenólicos y reducen el grado de reacción de estos con la 4-aminoantipirina. Se puede remover estos interferentes mediante la adición de sulfato de hierro en exceso.

Por otra parte, compuestos de azufre, como ácido sulfhídrico y dióxido de azufre, pueden interferir en la medida. Se eliminan por acidificación hasta pH 4.0 con ácido fosfórico, acompañada por un burbujeo suave de aire.

Finalmente, las grasas y alquitranes interfieren la determinación de fenoles. Se pueden remover mediante extracciones con cloroformo, a pH 12 (con hidróxido de sodio), por decantación. Si hay exceso de cloroformo, este se puede remover por calentamiento del agua en baño maría.

## **Materiales**

Balones aforados de 10, 100 y 1000 mL

Erlenmeyer de 250 mL

Micropipetas de 100 y 1000  $\mu$ L

Puntas para micropipeta, de 200 y 1000  $\mu$ L

Cajas de 96 pozos

**NOTA:** El material que se emplee debe estar completamente limpio y seco. En lo posible, evitar limpiar el material con hipoclorito para eliminar interferencias

### Reactivos

Ferricianuro de potasio

4-aminoantipirina

Cloruro de amonio (grado analítico, Merck, Lote A779045)

Amoniaco

Fenol cristal

Agua desionizada

### Equipos

Espectrofotómetro Cytation 3 ®

Balanza analítica

Vórtex

Cabina de extracción

### Preparación de soluciones

**Solución buffer de amonio:** Se prepara mediante la mezcla de cloruro de amonio y amoniaco concentrado. Pesar y disolver 676 mg de cloruro de amonio, previamente secado en un horno a 60°C por 24 horas, en 5.72 mL de amoniaco concentrado. Aforar hasta 10 mL con agua desionizada, empleando un balón aforado.

**NOTA:** La solución es estable por un mes si se almacena en un frasco hermético a temperatura ambiente.

**Solución de ferricianuro de potasio:** Se prepara disolviendo 800 mg de ferricianuro de potasio en 10 ml de agua desionizada, empleando un balón aforado.

**NOTA:** La solución es estable por un mes si se almacena en un frasco ambar hermético a temperatura ambiente y en oscuridad

Solución de 4-aminoantipirina: Se prepara disolviendo 500 mg de 4-aminoantipirina en 25 mL de agua desionizada, empleando un balón aforado.

**NOTA:** La solución es estable por un mes si se almacena en un frasco ambar hermético a temperatura ambiente y en oscuridad. El reactivo de 4-aminoantipirina se debe manejar con precaución en una cabina de extracción, debido a su toxicidad. Se recomienda almacenarlo en un frasco ambar en un desecador.

Solución madre de fenol: Se prepara disolviendo 100 mg de fenol cristal en 100 mL de agua desionizada, empleando un balón aforado.

**NOTA:** La solución es estable por seis meses si se almacena en un frasco ambar en un lugar fresco. El fenol se debe manipular en una cabina de extracción. Esta solución sirve para preparar soluciones de concentración conocida, como control de verificación de la curva de calibración.

Solución patrón de fenol: Se prepara llevando 1 mL de la solución madre a 100 mL, en un balón aforado, con agua desionizada. La concentración de esta solución es aproximadamente 10 ppm de fenol.

**NOTA:** Esta solución se debe preparar cada vez que se quiera volver a realizar la curva de calibración.

### **Curva de calibración**

En un ensayo típico se agrega en un tubo de reacción de 2,0 mL, 1000  $\mu$ L de soluciones de diferente concentración de fenol (preparadas a partir de la solución patrón) con ayuda de una micropipeta, tal y como se muestra en la Tabla.

Posteriormente agregar 20 µL de la solución buffer y, agitar fuertemente en un vórtex entre 30 y 60 segundos. Luego, adicionar 20 µL de la solución de piridina y volver a agitar en vórtex. Finalmente, agregar 20 µL del reactivo de ferricianuro y agitar en vórtex.

Dejar incubar la reacción por 15 minutos, a temperatura ambiente. El compuesto que se forma es estable por una hora. Realizar por triplicado cada ensayo.

**Tabla I-1. Mezclas de reacción para la elaboración de la curva de calibración**

#	Patrón de calibración (µL)	Agua desionizada (µL)	Buffer de amonio (µL)	Reactivo de antipirina (µL)	Reactivo de ferricianuro (µL)
1	1000	0	20	20	20
2	800	200	20	20	20
3	600	400	20	20	20
4	400	600	20	20	20
5	200	800	20	20	20
6	100	900	20	20	20
7	50	950	20	20	20
B*	0	1000	20	20	20

\* Blanco de los reactivos

Para medir la absorbancia de cada muestra, se sigue los siguientes pasos:

- l) Medir la absorbancia a 510 nm y 25°C de la caja vacía de 96 pozos, en el equipo Cytation 3®
- m) Depositar 100 µL de cada una de las mezclas de reacción en la caja de 96 pozos, incluido el blanco.
- n) Medir la absorbancia a 510 nm y 25°C en el equipo Cytation 3®

### Cálculos

Para determinar el valor de absorbancia de cada muestra, se desarrolla la siguiente ecuación:

$$Absorbancia_{muestra} = (A_{muestra,510} - A_{caja,510}) - (A_{blanco,510} - A_{caja,510})$$

Donde:

$A_{\text{muestra},510}$  = Absorbancia de la muestra a 510 nm

$A_{\text{caja},510}$  = Absorbancia de la caja vacía a 510 nm

$A_{\text{blanco},510}$  = Absorbancia del blanco de reactivos a 510 nm

Así mismo, para calcular el contenido de fenol en cada tubo de reacción se sigue la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$  = Concentración de fenol en el patrón mg/L.

$V_1$  = Volumen que se adicionó del patrón a cada tubo de reacción en  $\mu\text{L}$ .

$C_2$  = Volumen total de reacción en  $\mu\text{L}$ .

$V_2$  = Concentración final de fenol en el tubo de reacción en mg/L.

Se elabora la gráfica: Fenol (mg fenol/L) vs. Absorbancia promedio, la cual debe ser una línea recta con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,99. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la gráfica. El Coeficiente de Variación para cada punto no debe ser superior al 10%.

## Bibliografía

- Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J., & Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *BIORESOURCETECHNOLOGY*, 118, 61–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.055>
- Aida, T., Maruta, R., Tanabe, Y., Oshima, MinNonaka, T., Kujiraoka, H., Kumagai, Y., & Ota, M. (2016). Nutrient recycle from defatted microalgae (*Aurantiochytrium*) with hydrothermal treatment for microalgae cultivation. *Bioresourcetechnology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.078>
- Al-duri, B., & Alsoqyani, F. (2017). Supercritical water oxidation ( SCWO ) for the removal of nitrogen containing heterocyclic waste hydrocarbons . Part II : System kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 128(May), 412–418.  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.010>
- Al Hattab, M., & Ghaly, A. (2015). Production of Biodiesel from Marine and Freshwater Microalgae : A Review. *Advances in Research*, 3(2), 107–155.  
<https://doi.org/10.9734/AIR/2015/7752>
- Alcaraz, M. R., Fabiano, S. N., & Cámara, M. S. (2012). Determinación De Contenido Fenólico Total En Agua Superficial De Distintos Puntos De La Provincia De Santa Fe – Argentina – Haciendo Uso De Un Biosensor Enzimático Mediante Calibración Multivariada Por Cuadrados Parciales Mínimos , Pls. *Septimo Congreso de Medio Ambiente*, 1–22.
- Alimoradi, S., Stohr, H., Stagg-Williams, S., & Sturm, B. (2020). Effect of temperature on toxicity and biodegradability of dissolved organic nitrogen formed during hydrothermal liquefaction of biomass. *Chemosphere*, 238, 124573.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124573>
- Alnaizy, R., & Akgerman, A. U. (2000). Advanced oxidation of phenolic compounds. *Advances in Environmental Research*, 4(May), 233–244.
- Anastasakis, K., & Ross, A. B. (2011). Hydrothermal liquefaction of the brown macro-alga

- Laminaria Saccharina: Effect of reaction conditions on product distribution and composition. *Bioresource Technology*, 102(7), 4876–4883.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.031>
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques* (1st ed.). Elsevier Academic Press.
- Anku, W., Mamo, M., & Govender, P. (2017). Phenolic compounds in Water: Sources, reactivity, toxicity and treatment methods. In M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango, & M. del R. Garcia-Mateos (Eds.), *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications abundant* (p. 444). InTech.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/66927>
- Ansari, F. A., Gupta, S. K., Nasr, M., Rawat, I., & Bux, F. (2018). Evaluation of various cell drying and disruption techniques for sustainable metabolite extractions from microalgae grown in wastewater: A multivariate approach. *Journal of Cleaner Production*, 182, 634–643. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.098>
- APHA. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (21st ed.).
- Armandina, E., Tercero, R., Bertucco, A., & Brilman, D. W. F. W. (2015). Process water recycle in Hydrothermal Liquefaction of microalgae to enhance bio-oil yield. *Energy and Fuels*, 3. <https://doi.org/10.1021/ef502773w>
- Arun, J., Varshini, P., Prithvinath, P. K., Priyadarshini, V., & Gopinath, K. P. (2018). Enrichment of bio-oil after hydrothermal liquefaction (HTL) of microalgae *C. vulgaris* grown in wastewater: Bio-char and post HTL wastewater utilization studies. *Bioresource Technology*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.029>
- Azov, Y., & Goldman, J. C. (1982). Free Ammonia Inhibition of Algal Photosynthesis in Intensive Culture. *Applied And*, 43(4), 735–739.
- Bagnoud-Velásquez, M., Schmid-Staiger, U., Peng, G., Vogel, F., & Ludwig, C. (2015). First developments towards closing the nutrient cycle in a biofuel production process. *Algal Research*, 8, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.012>
- Baier, S. L., Clements, M., Griffiths, C. W., & Ihrig, J. E. (2009). Biofuels Impact on Crop and Food Prices: Using an Interactive Spreadsheet. *Social Science Research Network*, 967. <https://doi.org/10.2139/ssrn.1372839>
- Barbarino, E., & Louren, S. O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17, 447–460. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>
- Bashan, Y., Lopez, B. R., Huss, V. A. R., Amavizca, E., & de-Bashan, L. E. (2016).

- Chlorella sorokiniana* (formerly *C. vulgaris*) UTEX 2714, a non-thermotolerant microalga useful for biotechnological applications and as a reference strain. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 113–121. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0571-z>
- Baup, S., Jaffre, C., Wolbert, D., & Laplanche, A. (2000). Adsorption of pesticides onto granular activated carbon: Determination of surface diffusivities using simple batch experiments. *Adsorption*, 6(3), 219–228. <https://doi.org/10.1023/A:1008937210953>
- Becker, R., Dorgerloh, U., Paulke, E., Mumme, J., & Nehls, I. (2014). Hydrothermal Carbonization of Biomass : Major Organic Components of the Aqueous Phase. *Chemical Engineering and Technology*, 3, 511–518. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300401>
- Benatti, C. T., Granhen Tavares, C. R., & Guedes, T. A. (2006). Optimization of Fenton ' s oxidation of chemical laboratory wastewaters using the response surface methodology. *Journal of Environmental Engineering (United States)*, 80, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.08.014>
- Benvenuti, G., Bosma, R., Cuaresma, M., Janssen, M., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2015). Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1425–1431. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0470-8>
- Bermejo, M. D., & Cocero, M. J. (2006). Supercritical Water Oxidation: A Technical Review. *AIChE Journal*, 52(11), 3933–3951. <https://doi.org/10.1002/aic>
- Biller, P., & Ross, A. B. (2011). Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content. *Bioresource Technology*, 102(1), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.028>
- Biller, P., Ross, A. B., Skill, S. C., Lea-Langton, A., Balasundaram, B., Hall, C., Riley, R., & Llewellyn, C. A. (2012). Nutrient recycling of aqueous phase for microalgae cultivation from the hydrothermal liquefaction process. *Algal Research*, 1(1), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.02.002>
- Biller, P., Ross, A. B., Skill, S. C., Lea-langton, A., Balasundaram, B., Hall, C., Riley, R., & Llewellyn, C. A. (2012). Nutrient recycling of aqueous phase for microalgae cultivation from the hydrothermal liquefaction process. *Algal Research*, 1(1), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.02.002>
- Biller, Patrick, Madsen, R. B., Klemmer, M., Becker, J., Iversen, B. B., & Glasius, M. (2016). Effect of hydrothermal liquefaction aqueous phase recycling on bio- crude

- yields and composition. *Bioresource Technology*, 220, 190–199.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.053>
- Bio-Rad. (2006). *Protein Assay*. Cold Spring Harbor Protocols.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prodprot15>
- Blair, M. F., Kokabian, B., & Gude, V. G. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 665–674. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Boer, K. De, & Moheimani, N. R. (2012). Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1681–1698. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9835-z>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bradford, Marion M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brand, S., Hardi, F., Kim, J., & Suh, D. J. (2014). Effect of heating rate on biomass liquefaction: Differences between subcritical water and supercritical ethanol. *Energy*, 68, 420–427. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.02.086>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Brown, M. R., & Mccausland, M. A. (1998). The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*, 165, 281–293.
- Brown, T. M., Duan, P., & Savage, P. E. (2010). Hydrothermal liquefaction and gasification of *Nannochloropsis* sp. *Energy and Fuels*, 24(6), 3639–3646.  
<https://doi.org/10.1021/ef100203u>
- Byreddy, A. R., Gupta, A., Barrow, C. J., & Puri, M. (2016). A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 125,

- 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.04.002>
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *19*, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
- Cao, Y., Wang, Y., Riley, J. T., & Pan, W. P. (2006). A novel biomass air gasification process for producing tar-free higher heating value fuel gas. *Fuel Processing Technology*, *87*(4), 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2005.10.003>
- Chang, I. S., & Kim, S. N. (2005). Wastewater treatment using membrane filtration - Effect of biosolids concentration on cake resistance. *Process Biochemistry*, *40*(3–4), 1307–1314. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.019>
- Chen, C., Lu, Z., Ma, X., Long, J., Peng, Y., Hu, L., & Lu, Q. (2013). Oxy-fuel combustion characteristics and kinetics of microalgae *Chlorella vulgaris* by thermogravimetric analysis. *Bioresource Technology*, *144*, 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.011>
- Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, *102*(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Chen, W.-T., Tang, L., Qian, W., Scheppe, K., Nair, K., Wu, Z., Gai, C., Zhang, P., & Zhang, Y. (2016). Extract Nitrogen-Containing Compounds in Biocrude Oil Converted from Wet Biowaste via Hydrothermal Liquefaction. *Sustainable Chemistry and Engineering*, *2*. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01645>
- Chen, W.-T., Zhang, Y., Zhang, J., Schideman, L., Yu, G., Zhang, P., & Minarick, M. (2014). Co-liquefaction of swine manure and mixed-culture algal biomass from a wastewater treatment system to produce bio-crude oil. *Applied Energy*, *128*, 209–216. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2014.04.068>
- Chen, W. H., Huang, M. Y., Chang, J. S., & Chen, C. Y. (2015). Torrefaction operation and optimization of microalga residue for energy densification and utilization. *Applied Energy*, *154*, 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.05.068>
- Chen, W. H., Peng, J., & Bi, X. T. (2015). A state-of-the-art review of biomass torrefaction, densification and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *44*, 847–866. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.12.039>
- Chen, X., Ma, X., Peng, X., Lin, Y., Wang, J., & Zheng, C. (2018). Effects of aqueous

- phase recirculation in hydrothermal carbonization of sweet potato waste. *Bioresource Technology*, 267(381), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.032>
- Cheng, Y. S., Zheng, Y., & VanderGheynst, J. S. (2011). Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. *Lipids*, 46(1), 95–103. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3494-0>
- Cherad, R., Onwudili, J. A., Biller, P., Williams, P. T., & Ross, A. B. (2016a). Hydrogen production from the catalytic supercritical water gasification of process water generated from hydrothermal liquefaction of microalgae. *Fuel*, 166, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.10.088>
- Cherad, R., Onwudili, J. A., Biller, P., Williams, P. T., & Ross, A. B. (2016b). Hydrogen production from the catalytic supercritical water gasification of process water generated from hydrothermal liquefaction of microalgae. *Fuel*, 166, 24–28.
- Cherad, R., Onwudili, J. A., Biller, P., Williams, P. T., & Ross, A. B. (2016c). Hydrogen production from the catalytic supercritical water gasification of process water generated from hydrothermal liquefaction of microalgae. *Fuel*, 166, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.10.088>
- Chiaramonti, D., Oasmaa, A., & Solantausta, Y. (2007). Power generation using fast pyrolysis liquids from biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11(6), 1056–1086. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2005.07.008>
- Christensen, P. S., Peng, G., Vogel, F., & Iversen, B. B. (2014). Hydrothermal liquefaction of the microalgae *Phaeodactylum tricornutum*: Impact of reaction conditions on product and elemental distribution. *Energy and Fuels*, 28(9), 5792–5803. <https://doi.org/10.1021/ef5012808>
- Ciabatti, I., Tognotti, F., & Lombardi, L. (2010). Treatment and reuse of dyeing effluents by potassium ferrate. *Desalination*, 250(1), 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.06.019>
- Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R., & Steyer, J. (2011). Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology*, 102(1), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.154>
- Corley, R. (1998). Productividad de la palma de aceite Aspectos fisiológicos. *Palmas*, 19(Especial), 162–168.
- Costanzo, W., Jena, U., Hilten, R., Das, K. C., & Kastner, J. R. (2015). Low temperature hydrothermal pretreatment of algae to reduce nitrogen heteroatoms and generate nutrient recycle streams. *Algal Research*, 12, 377–387.

- <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.019>
- Crini, G., & Lichtfouse, E. (2019). Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. *Environmental Chemistry Letters*, 17(1), 145–155.  
<https://doi.org/10.1007/s10311-018-0785-9>
- Croiset, E., Rice, S. F., & Hanush, R. G. (1997). Hydrogen Peroxide Decomposition in Supercritical Water. *AIChE Journal*, 43(9), 2343–2352.  
<https://doi.org/10.1002/aic.690430919>
- Cui, S., & Brummer, Y. (2010). Understanding Carbohydrate Analysis. In *Food Carbohydrates* (pp. 67–104). Taylor & Francis Group.  
<https://doi.org/10.1201/9780203485286.ch2>
- Dannis, M. (1951). Determination of Phenols by the Amino-Antipyrine Method. *Sewage and Industrial Wastes*, 23(12), 1516–1522.
- Debellefontaine, H., Chakchouk, M., Foussard, J. N., Tissot, D., & Striolo, P. (1996). Treatment of organic aqueous wastes: Wet air oxidation and wet peroxide oxidation. *Environmental Pollution*, 92(2), 155–164. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)00100-X](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)00100-X)
- Demirbas, A. (2016). Calculation of higher heating values of fatty acids. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, 38(18), 2693–2697.  
<https://doi.org/10.1080/15567036.2015.1115924>
- Demirbaş, A. (2001). Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 42(11), 1357–1378.  
[https://doi.org/10.1016/S0196-8904\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0196-8904(00)00137-0)
- Deniel, M., Haarlemmer, G., Roubaud, A., Weiss-hortala, E., & Fages, J. (2016). Bio-oil Production from Food Processing Residues: Improving the Bio-oil Yield and Quality by Aqueous Phase Recycle in Hydrothermal Liquefaction of Blackcurrant ( *Ribes nigrum* L .) Pomace Maxime De n. *Energy and Fuels*, 5.  
<https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b00441>
- Dhankhar, R., & Hooda, A. (2011). Fungal biosorption-an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology*, 32(5), 467–491. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.572922>
- Du, Z., Hu, B., Shi, A., Ma, X., Cheng, Y., Chen, P., Liu, Y., Lin, X., & Ruan, R. (2012). Cultivation of a microalga *Chlorella vulgaris* using recycled aqueous phase nutrients from hydrothermal carbonization process. *Bioresource Technology*, 126, 354–357.

- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.062>
- Duan, P., Yang, S., Xu, Y., Wang, F., Zhao, D., Weng, Y., & Shi, X. (2018). Integration of hydrothermal liquefaction and supercritical water gasification for improvement of energy recovery from algal biomass. *Energy*.  
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.05.044>
- Dubber, D., & Gray, N. F. (2010). Replacement of chemical oxygen demand (COD) with total organic carbon (TOC) for monitoring wastewater treatment performance to minimize disposal of toxic analytical waste. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 45(12), 1595–1600. <https://doi.org/10.1080/10934529.2010.506116>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Eboibi, B. E., Lewis, D. M., Ashman, P. J., & Chinnasamy, S. (2014). Effect of operating conditions on yield and quality of biocrude during hydrothermal liquefaction of halophytic microalga *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*, 170, 20–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.083>
- Edmundson, S., Huesemann, M., Kruk, R., Lemmon, T., Billing, J., Schmidt, A., & Anderson, D. (2017). Phosphorus and nitrogen recycle following algal bio-crude production via continuous hydrothermal liquefaction. *Algal Research*, July, 0–1.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.016>
- Ekpo, U., Ross, A. B., Camargo-valero, M. A., & Williams, P. T. (2016). A comparison of product yields and inorganic content in process streams following thermal hydrolysis and hydrothermal processing of microalgae, manure and digestate. *Bioresource Technology*, 200, 951–960. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.018>
- El-Shimi, H. I., Attia, N. K., El-Sheltawy, S. T., & El-Diwani, G. I. (2013). Biodiesel Production from *Spirulina-Platensis* Microalgae by In-Situ Transesterification Process. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 3(9), 224–233.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/jsbs.2013.33031>
- Elliott, D. C., Hart, T. R., Schmidt, A. J., Neuenschwander, G. G., Rotness, L. J., Olarte, M. V, Zacher, A. H., Albrecht, K. O., Hallen, R. T., & Holladay, J. E. (2013). Process development for hydrothermal liquefaction of algae feedstocks in a continuous-flow reactor. *Algal Research*, 2(4), 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.08.005>
- Environment Agency. (2007). *Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances: 2,4-dichlorophenol*.

- EPA. (1978). *Method 420.1 : Phenolics ( Spectrophotometric, Manual 4 - AAP With Distillation )*.
- Erkelens, M., Ball, A. S., & Lewis, D. M. (2015a). Bioresource Technology The application of activated carbon for the treatment and reuse of the aqueous phase derived from the hydrothermal liquefaction of a halophytic *Tetraselmis* sp . *Bioresource Technology*, 182, 378–382. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.129>
- Erkelens, M., Ball, A. S., & Lewis, D. M. (2015b). The application of activated carbon for the treatment and reuse of the aqueous phase derived from the hydrothermal liquefaction of a halophytic *Tetraselmis* sp . *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.129>
- Erkonak, H., Sogut, O. O., & Akgun, M. (2008). Treatment of olive mill wastewater by supercritical water oxidation. *Journal of Supercritical Fluids*, 46, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.04.006>
- Faeth, J. L., Savage, P. E., Jarvis, J. M., Mckenna, A. M., & Savage, P. E. (2016). Characterization of Products from Fast and Isothermal Hydrothermal Liquefaction of Microalgae. *AIChE Journal*, 62(3). <https://doi.org/10.1002/aic>
- Faeth, J. L., Valdez, P. J., & Savage, P. E. (2013). Fast hydrothermal liquefaction of nanochloropsis sp. to produce biocrude. *Energy and Fuels*, 27(3), 1391–1398. <https://doi.org/10.1021/ef301925d>
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., Parrella, A., & Temussi, F. (2003). Environmental Effects Caused by Olive Mill Wastewaters : Toxicity Comparison of Low-Molecular-Weight Phenol Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1005–1009.
- Frank, E. D., Elgowainy, A., & Han, J. (2013). Life cycle comparison of hydrothermal liquefaction and lipid extraction pathways to renewable diesel from algae. *Mitig Adapt Strateg Glob Change*, 18, 137–158. <https://doi.org/10.1007/s11027-012-9395-1>
- Fricke, K., Santen, H., Wallmann, R., Hüttner, A., & Dichtl, N. (2007). Operating problems in anaerobic digestion plants resulting from nitrogen in MSW. *Waste Management*, 27(1), 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.03.003>
- Frings, C., & Dunn, R. (1970). A Colorimetric Method for Determination of Total Serum Lipids Based on the Sulfo-phospho-vanillin Reaction. *American Journal of Clinical Pathology*, 53(1), 89–91. <https://doi.org/10.1093/ajcp/53.1.89>

- Fu, W., Gudmundsson, O., Feist, A. M., Herjolfsson, G., Brynjolfsson, S., & Palsson, B. Ø. (2012). Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, *161*(3), 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.004>
- Fuhs, G. W., & Chen, M. (1975). Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbial Ecology*, *2*(2), 119–138. <https://doi.org/10.1007/BF02010434>
- Fushimi, C., Kakimura, M., Tomita, R., Umeda, A., & Tanaka, T. (2016). Enhancement of nutrient recovery from microalgae in hydrothermal liquefaction using activated carbon. *Fuel Processing Technology*, *148*, 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.03.006>
- Gai, C., Zhang, Y., Chen, W.-T., Zhou, Y., Schideman, L., Zhang, P., Tommaso, G., Kuo, C.-T., & Dong, Y. (2014). Characterization of aqueous phase from the hydrothermal liquefaction of *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresource Technology*, *43*(6), 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.118>
- Gamby, J., Taberna, P. L., Simon, P., Fauvarque, J. F., & Chesneau, M. (2001). Studies and characterisations of various activated carbons used for carbon/carbon supercapacitors. *Journal of Power Sources*, *101*(1), 109–116. [https://doi.org/10.1016/S0378-7753\(01\)00707-8](https://doi.org/10.1016/S0378-7753(01)00707-8)
- García-jarana, M. B., Kings, I., Sánchez-oneto, J., Portela, J. R., & Al-duri, B. (2013). The Journal of Supercritical Fluids Supercritical water oxidation of nitrogen compounds with multi-injection of oxygen. *The Journal of Supercritical Fluids*, *80*(2), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.04.004>
- Garcia Alba, L., Torri, C., Samor??, C., Van Der Spek, J., Fabbri, D., Kersten, S. R. A., & Brillman, D. W. F. (2012). Hydrothermal treatment (HTT) of microalgae: Evaluation of the process as conversion method in an algae biorefinery concept. *Energy and Fuels*, *26*(1), 642–657. <https://doi.org/10.1021/ef201415s>
- Garcia, L., Torri, C., Fabbri, D., Kersten, S. R. A., & Wim, D. W. F. (2013). Microalgae growth on the aqueous phase from Hydrothermal Liquefaction of the same microalgae. *Chemical Engineering Journal*, *228*, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.097>
- Georgiou, C. D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., & Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: A hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *391*(1),

- 391–403. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1996-x>
- Gernaey, K. V., Van Loosdrecht, M. C. M., Henze, M., Lind, M., & Jørgensen, S. B. (2004). Activated sludge wastewater treatment plant modelling and simulation: State of the art. *Environmental Modelling and Software*, *19*(9), 763–783. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2003.03.005>
- Glaze, W. H., Kang, J. W., & Chapin, D. H. (1987). The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone: Science & Engineering*, *9*(4), 335–352. <https://doi.org/10.1080/01919518708552148>
- Gonçalves, R., Frazao, A., Pedrosa, R., Spindola, D., Cristina, V., Brasileiro-Vidal, A. C., De Araújo, D., & Marques, A. (2018). Chemosphere *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. *Chemosphere*, *204*, 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.039>
- Gopalan, S., & Savage, P. E. (1995). A Reaction Network Model for Phenol Oxidation in Supercritical Water. *AIChE Journal*, *41*(8).
- Griffiths, M. J., Hille, R. P. Van, & Harrison, S. T. L. (2014). The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*, 2345–2356. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5442-4>
- Guo, Y., Yeh, T., Song, W., Xu, D., & Wang, S. (2015). A review of bio-oil production from hydrothermal liquefaction of algae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *48*, 776–790. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.049>
- Haber, F., & Weiss, J. (1932). *The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts* \*. 332–351.
- He, Z., Xu, D., Liu, L., Wang, Y., Wang, S., Guo, Y., & Jing, Z. (2018). Product characterization of multi-temperature steps of hydrothermal liquefaction of *Chlorella* microalgae. *Algal Research*, *33*(January), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.013>
- Heredia-arroyo, T., Wei, W., Ruan, R., & Hu, B. (2011). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, *35*, 2245–2253. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.036>
- Hii, K., Baroutian, S., Parthasarathy, R., Gapes, D. J., & Eshtiaghi, N. (2014). A review of

- wet air oxidation and Thermal Hydrolysis technologies in sludge treatment. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 155, 289–299.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.066>
- HiP. (n.d.). *High Pressure Equipment. Technical Information*.  
<https://www.highpressure.com/>
- Hognon, C., Delrue, F., & Texier, J. (2014). Comparison of pyrolysis and hydrothermal liquefaction of *Chlamydomonas reinhardtii*. Growth studies on the recovered hydrothermal aqueous phase. *Biomass and Bioenergy*, 73, 23–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.11.025>
- Hon, T. H. E., & Costa, M. (2016). Shell Sustainability Report 2016. *Royal Dutch Shell Plc*.
- Hosseini, S. E., Wahid, M. A., Salehirad, S., & Seis, M. M. (2013). Evaluation of Palm Oil Combustion Characteristics by Using the Chemical Equilibrium with Application (CEA) Software. *Applied Mechanics and Materials*, 388, 268–272.  
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.388.268>
- Hu, Y., Feng, S., Yuan, Z., Xu, C. C., & Bassi, A. (2017). Investigation of aqueous phase recycling for improving bio-crude oil yield in hydrothermal liquefaction of algae. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.033>
- IEA, & OECD. (2016). *World Energy Outlook: Energy and Air Pollution*.
- Illman, A. M., Scragg, A. H., & Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 631–635.
- Jena, U., & Das, K. C. (2011). Comparative evaluation of thermochemical liquefaction and pyrolysis for bio-oil production from microalgae. *Energy and Fuels*, 25(11), 5472–5482. <https://doi.org/10.1021/ef201373m>
- Jena, U., Das, K. C., & Kastner, J. R. (2011). Effect of operating conditions of thermochemical liquefaction on biocrude production from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 102(10), 6221–6229.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.057>
- Jena, U., Vaidyanathan, N., Chinnasamy, S., & Das, K. C. (2011a). Evaluation of microalgae cultivation using recovered aqueous co-product from thermochemical liquefaction of algal biomass. *Bioresource Technology*, 102(3), 3380–3387.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.111>
- Jena, U., Vaidyanathan, N., Chinnasamy, S., & Das, K. C. (2011b). Evaluation of

- microalgae cultivation using recovered aqueous co-product from thermochemical liquefaction of algal biomass. *Bioresource Technology*, 102(3), 3380–3387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.111>
- Jiang, J., & Savage, P. E. (2018). Metals and Other Elements in Biocrude from Fast and Isothermal Hydrothermal Liquefaction of Microalgae. *Energy and Fuels*, 32(4), 4118–4126. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b03144>
- Jones, C., Hare, D., & Compton, S. (1989). Measuring Plant Protein with the Bradford Assay. 1. Evaluation and Standard Method. *Journal of Chemical Ecology*, 15(3).
- K. Mandalam, R., & O Palsson, B. (1998). Elemental Balancing of Biomass and Medium Composition Enhances Growth Capacity in High-density *Chlorella vulgaris* Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 59, 605–611.
- Kabadayi, A., Cem, I., & Yanik, J. (2017). Bioresource Technology Effects of spent liquor recirculation in hydrothermal carbonization. *Bioresource Technology*, 226, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.015>
- Kasina, M., Wendorff-Belon, M., Kowalski, P. R., & Michalik, M. (2019). Characterization of incineration residues from wastewater treatment plant in Polish city: a future waste based source of valuable elements? *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 21(4), 885–896. <https://doi.org/10.1007/s10163-019-00845-1>
- Killilea, R., Swallow, K. C., & Hong, G. T. (1992). The Fate of Nitrogen in Supercritical-Water Oxidation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 5, 72–78.
- Kim, J., Chung, Y., Shin, D., Kim, M., Lee, Y., Lim, Y., & Lee, D. (2003). Chlorination by-products in surface water treatment process. *Desalination*, 151(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00967-0](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00967-0)
- Kim, W., Min, J., Geun, P., Gim, H., Si, D. K., & Kim, W. (2012). Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 19–27. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0612-1>
- Knight, J. A., Anderson, S., & Rawle, J. M. (1972). Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical Chemistry*, 18(3), 199–202.
- Knight, Joseph A, Anderson, S., & Rawle, J. M. (1972). ChemicalBasisof the Sulfo-phospho-vanillin Reactionfor Estimating Total Serum Lipids. *Clinical Chemistry*, 18(3), 199–202. <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.3.199>
- Kolaczkowski, S. T., Plucinski, P., Beltran, F. J., Rivas, F. J., & Mclurgh, D. B. (1999). *Wet air oxidation : a review of process technologies and aspects in reactor design*. 73,

143–160.

- Kondru, A. K., Kumar, P., & Chand, S. (2009). Catalytic wet peroxide oxidation of azo dye (Congo red) using modified Y zeolite as catalyst. *Journal of Hazardous Materials*, 166(1), 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.11.042>
- Kritzer, P. (2004). Corrosion in high-temperature and supercritical water and aqueous solutions : A review. *The Journal of Supercritical Fluids*, 29(4), 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(03)00031-7)
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., & Das, D. (2014). Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresource Technology*, 167, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.118>
- Kumar, S. (2012). *Sub- and Supercritical Water-Based Processes for Microalgae to Biofuels* (pp. 467–493). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5110-1\\_25](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5110-1_25)
- Kumar, V., Nanda, M., Joshi, H. C., Singh, A., & Sharma, S. (2018). Production of biodiesel and bioethanol using algal biomass harvested from fresh water river. *Renewable Energy*, 116, 606–612. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.10.016>
- L.S. Clesceri, A.R. Greenberg, R. R. T. (2010). *Determinación colorimétrica de fenoles en agua por el método de la 4- aminoantipirina*. 5(Revisión 1), 4–9.
- Lachmann, S. C., & Spijkerman, E. (2019). Nitrate or ammonium : Influences of nitrogen source on the physiology of a green alga. *Ecology and Evolution*, 10, 1070–1082. <https://doi.org/10.1002/ece3.4790>
- Laliberté, G., & De La Noüe, J. (1993). Auto-, hetero- and mixotrophic-growt of *chlamydomonas humicola* on acetate. *Journal of Phycologie*, 29(6), 612–620.
- Lasso, A. M. (2007). Fósforo soluble en agua por el método del ácido ascórbico. *Instituto De Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales*, 3, 1–11. <http://www.ideam.gov.co/>
- Lee, G., Nunoura, T., Matsumura, Y., & Yamamoto, K. (2002). Comparison of the effects of the addition of NaOH on the decomposition of 2-chlorophenol and phenol in supercritical water and under supercritical water oxidation conditions. *Journal of Supercritical Fluids*, 24, 239–250.
- Lee, R. A., & Lavoie, J. (2012). From first- to third-generation biofuels : Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, August, 6–11. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0010>
- Leng, L., & Huang, H. (2018). An overview of the effect of pyrolysis process parameters

- on biochar stability. *Bioresource Technology*, 270(September), 627–642.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.030>
- Li, C., Yang, X., Zhang, Z., Zhou, D., Zhang, L., Zhang, S., & Chen, J. (2013). Hydrothermal Liquefaction of Desert Shrub *Salix psammophila* to High Value - added Chemicals and Hydrochar with Recycled Processing Water. *Bioresource Technology*, 8(2009), 2981–2997.
- Li, H., Liu, Z., Zhang, Y., Li, B., Lu, H., Duan, N., Liu, M., Zhu, Z., & Si, B. (2014). Conversion efficiency and oil quality of low-lipid high-protein and high-lipid low-protein microalgae via hydrothermal liquefaction. *Bioresource Technology*, 154, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.074>
- Li, J., Wang, S., Li, Y., Jiang, Z., Xu, T., & Zhang, Y. (2020). Supercritical water oxidation and process enhancement of nitrogen-containing organics and ammonia. *Water Research*, 185(x), 116222. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116222>
- Li, J., Wang, S., Li, Y., Ren, M., Jiang, Z., Zhang, J., & Yang, C. (2020). Experimental research and commercial plant development for harmless disposal and energy utilization of petrochemical sludge by supercritical water oxidation. *Chemical Engineering Research and Design*, 162, 258–272.  
<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.08.006>
- Li, Yalin, Leow, S., Fedders, A. C., Sharma, B. K., Guest, J. S., & Strathmann, T. J. (2017). Quantitative multiphase model for hydrothermal liquefaction of algal biomass. *Green Chemistry*, 19(4), 1163–1174. <https://doi.org/10.1039/c6gc03294j>
- Li, Yanhui, & Wang, S. (2020). Supercritical Water Oxidation for Environmentally Friendly Treatment of Organic Wastes. In I. Piro (Ed.), *Advanced Supercritical Fluids Technologies*. IntechOpen.
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31, 1043–1049. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>
- Lin, S. H., & Lo, C. C. (1997). Fenton process for treatment of desizing wastewater. *Water Research*, 31(8), 2050–2056. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00024-9)
- Liu, L., Zhao, Y., Jiang, X., Wang, X., & Liang, W. (2018). Lipid accumulation of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic cultivation using acetate and ammonium. *Bioresource Technology*, 262(April), 342–346.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.092>

- Liu, X., Saydah, B., Eranki, P., Colosi, L. M., Mitchell, B. G., Rhodes, J., & Clarens, A. F. (2013). Pilot-scale data provide enhanced estimates of the life cycle energy and emissions profile of algae biofuels produced via hydrothermal liquefaction. *Bioresource Technology*, *148*, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.112>
- López Barreiro, D., Bauer, M., Hornung, U., Posten, C., Kruse, A., & Prins, W. (2015). Cultivation of microalgae with recovered nutrients after hydrothermal liquefaction. *Algal Research*, *9*, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.007>
- López Barreiro, D., Prins, W., Ronsse, F., & Brilman, W. (2013a). Hydrothermal liquefaction ( HTL ) of microalgae for biofuel production : State of the art review and future prospects. *Biomass and Bioenergy*, *53*(2), 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.029>
- López Barreiro, D., Prins, W., Ronsse, F., & Brilman, W. (2013b). Hydrothermal liquefaction (HTL) of microalgae for biofuel production: State of the art review and future prospects. *Biomass and Bioenergy*, *53*(0), 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.029>
- López Barreiro, D., Riede, S., Hornung, U., Kruse, A., & Prins, W. (2015). Hydrothermal liquefaction of microalgae: Effect on the product yields of the addition of an organic solvent to separate the aqueous phase and the biocrude oil. *Algal Research*, *12*, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.025>
- Luis, A. De, Lombraña, J. I., Varona, F., & Menéndez, A. (2009). Kinetic study and hydrogen peroxide consumption of phenolic compounds oxidation by Fenton's reagent. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *26*(1), 48–56.
- Luz, E., Moreno, M., Hernandez, J., & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, *36*, 2941–2948.
- Maddi, B., Panisko, E., Wietsma, T., Lemmon, T., Swita, M., Albrecht, K., & Howe, D. (2016). Quantitative characterization of the aqueous fraction from hydrothermal liquefaction of algae. *Biomass and Bioenergy*, *93*, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.07.010>
- Madsen, R. B., Biller, P., Jensen, M. M., Becker, J., Iversen, B. B., & Glasius, M. (2016). Predicting the Chemical Composition of Aqueous Phase from Hydrothermal Liquefaction of Model Compounds and Biomasses. *Energy and Fuels*, *30*(12),

- 10470–10483. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b02007>
- Márquez, J. J. R., Levchuk, I., & Sillanpää, M. (2018). Application of catalytic wet peroxide oxidation for industrial and urban wastewater treatment: A review. *Catalysts*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/catal8120673>
- Martino, C. J., & Savage, P. E. (1997). Supercritical Water Oxidation Kinetics , Products , and Pathways for CH<sub>3</sub> - and CHO-Substituted Phenols. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *36*, 1391–1400. <https://doi.org/10.1021/ie960697q>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Matsumura, Y., Minowa, T., Potic, B., Kersten, S. R. A., Prins, W., Van Swaaij, W. P. M., Van De Beld, B., Elliott, D. C., Neuenschwander, G. G., Kruse, A., & Antal, M. J. (2005). Biomass gasification in near- and super-critical water: Status and prospects. *Biomass and Bioenergy*, *29*(4), 269–292. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.04.006>
- McMahon, A., Lu, H., & Butovich, I. A. (2013). The spectrophotometric sulfo-phosphovanillin assessment of total lipids in human meibomian gland secretions. *Lipids*, *48*(5), 513–525. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3755-9>
- Megharaj, M., Pearson, H. W., & Venkateswarlu, K. (1992). Effects of phenolic compounds on growth and metabolic activities of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil. *Plant and Soil*, *140*, 25–34.
- Melgarejo, L. M. (2010). *Experimentos en fisiología vegetal*. Universidad Nacional de Colombia.
- Miao, X., Wu, Q., & Yang, C. (2004). Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *71*(2), 855–863. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2003.11.004>
- Michalak, I., Marycz, K., Basińska, K., & Chojnacka, K. (2014). Using SEM-EDX and ICP-OES to investigate the elemental composition of green macroalga *vaucheria sessilis*. *Scientific World Journal*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/891928>
- Resolucion 631-2015, Pub. L. No. 631, 62 (2015).
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, *155*, 330–333.

- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Munoz, M., Pedro, Z. M. De, Casas, J. A., & Rodriguez, J. J. (2013). Improved wet peroxide oxidation strategies for the treatment of chlorophenols. *Chemical Engineering Journal*, 228, 646–654. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.057>
- Myers, R. H., & Montgomery, D. C. (1997). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. In *Journal of Statistical Planning and Inference* (Vol. 59). Wiley.
- Neveux, N., Yuen, A. K. L., Jazrawi, C., Magnusson, M., Haynes, B. S., Masters, A. F., Montoya, A., Paul, N. A., Maschmeyer, T., & Nys, R. De. (2014). Biocrude yield and productivity from the hydrothermal liquefaction of marine and freshwater green macroalgae. *Bioresource Technology*, 155, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.083>
- Nielsen, S. S. (2017). Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates. In *Food Analysis Laboratory Manual* (pp. 47–53). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6>
- NIVA. (2008). *The toxicity of selected amines and secondary products to aquatic organisms: A review* (Issue 5698).
- Papadopoulos, A. E., Fatta, D., & Loizidou, M. (2007). Development and optimization of dark Fenton oxidation for the treatment of textile wastewaters with high organic load. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 558–563. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.083>
- Patel, B., Guo, M., Chong, C., Sarudin, S. H. M., & Hellgardt, K. (2016). Hydrothermal upgrading of algae paste: Inorganics and recycling potential in the aqueous phase. *Science of the Total Environment*, 568, 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.041>
- Patel, B., & Hellgardt, K. (2015). Hydrothermal upgrading of algae paste in a continuous flow reactor. *Bioresource Technology*, 191, 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.012>
- Pekakis, P. A., Xekoukoulotakis, N. P., & A, D. M. (2006). Treatment of textile dyehouse wastewater by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Water Research*, 40, 1276–1286. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.019>
- Peng, W., Wu, Q., Tu, P., & Zhao, N. (2001). Pyrolytic characteristics of microalgae as renewable energy source determined by thermogravimetric analysis. *Bioresource Technology*, 80(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00072-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00072-4)

- Peterson, A. A., Vogel, F., Lachance, R. P., Fröling, M., Antal, Jr., M. J., & Tester, J. W. (2008). Thermochemical biofuel production in hydrothermal media: A review of sub- and supercritical water technologies. *Energy & Environmental Science*, 1(1), 32. <https://doi.org/10.1039/b810100k>
- Phani, K., Dandamudi, R., Muppaneni, T., Markovski, J. S., Lammers, P., & Deng, S. (2019). Hydrothermal liquefaction of green microalga *Kirchneriella* sp . under sub- and super-critical water conditions. *Biomass and Bioenergy*, 120(May 2018), 224–228. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.11.021>
- Portela, J. R., Nebot, E., & Mart, E. (2001). Kinetic comparison between subcritical and supercritical water oxidation of phenol. *Chemical Engineering Journal*, 81, 287–299.
- Posten, C., & Schaub, G. (2009). Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels-A process view. *Journal of Biotechnology*, 142(1), 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.03.015>
- Prabakaran, P., & Ravindran, A. D. (2011). A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology*, 53(2), 150–154. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03082.x>
- Qian, L., Wang, S., Xu, D., Guo, Y., Tang, X., & Wang, L. (2015). Treatment of sewage sludge in supercritical water and evaluation of the combined process of supercritical water gasification and oxidation. *Bioresource Technology*, 176, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.125>
- Raheem, A., Sivasangar, S., Wan Azlina, W. A. K. G., Taufiq Yap, Y. H., Danquah, M. K., & Harun, R. (2015). Thermogravimetric study of *Chlorella vulgaris* for syngas production. *Algal Research*, 12, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.003>
- Rai, M. P., Nigam, S., & Sharma, R. (2013). Response of growth and fatty acid compositions of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic cultivation with acetate and glycerol for bioenergy application. *Biomass and Bioenergy*, 58, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.08.038>
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (1st ed.). Blackwell Science Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995280>
- Rizzo, A. M., Prussi, M., Bettucci, L., Libelli, I. M., & Chiaramonti, D. (2013). Characterization of microalga *Chlorella* as a fuel and its thermogravimetric behavior. *Applied Energy*, 102, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.08.039>
- Rodriguez, C. H. (2015). *El Instituto De Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales*.

9. <http://www.ideam.gov.co/>
- Rueda-Marquez, J. J., Levchuk, I., Salcedo, I., Acevedo-merino, A., & Manzano, M. A. (2016). Post-treatment of refinery wastewater effluent using a combination of AOPs ( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> photolysis and catalytic wet peroxide oxidation ) for possible water reuse . Comparison of low and medium pressure lamp performance. *Water Research*, 91, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.051>
- Rueda-Márquez, J. J., Pintado-Herrera, M. G., Martín-Díaz, M. L., Acevedo-Merino, A., & Manzano, M. A. (2015). Combined AOPs for potential wastewater reuse or safe discharge based on multi-barrier treatment (microfiltration-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV-catalytic wet peroxide oxidation). *Chemical Engineering Journal*, 270, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.02.011>
- Safi, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3(1), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.12.004>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014a). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35(July), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014b). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Sanabria, D. (2004). Fósforo total en agua por digestión ácida, método del ácido ascórbico. In *IDEAM* (Vol. 008). [http://www.fing.edu.uy/imfia/cursos/hidrometria/material/Guia\\_de\\_Monitoreo.pdf](http://www.fing.edu.uy/imfia/cursos/hidrometria/material/Guia_de_Monitoreo.pdf)
- Sanz-luque, E., Chamizo-ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (2015). Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae Overview of Nitrate Assimilation. *Frontiers in Plant Science*, 6(October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899>
- Savage, P. E. (1999). Organic Chemical Reactions in Supercritical Water. *Chemical Reviews*, 99(2), 603–622. <https://doi.org/10.1021/cr9700989>
- Savage, P. E., Duan, P., & Savage, P. E. (2011). Hydrothermal Liquefaction of a Microalga with Heterogeneous Catalysts Hydrothermal Liquefaction of a Microalga

- with Heterogeneous Catalysts. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, January 2011, 52–61. <https://doi.org/10.1021/ie100758s>
- Scragg, A. H. (2006). The effect of phenol on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* VT-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 796–799. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.018>
- Selvaratman, T., Reddy, H., Muppaneni, T., Holguin, F. O., Nirmalakhandan, N., Lammers, P. J., & Deng, S. (2015). Optimizing energy yields from nutrient recycling using sequential hydrothermal liquefaction with *Galdieria sulphuraria*. *Algal Research*, 12, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.007>
- Shakya, R. (2014). *Hydrothermal Liquefaction of Algae for Bio-oil Production*. Auburn University.
- Shakya, R., Adhikari, S., Mahadevan, R., Shanmugam, S. R., Nam, H., Barbary, E., & Dempster, T. A. (2017). Influence of biochemical composition during hydrothermal liquefaction of algae on product yields and fuel properties. *Bioresource Technology*, 243, 1112–1120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.046>
- Shanmugam, S. R., Adhikari, S., & Shakya, R. (2017). Hydrothermal Liquefaction of Algae Abstract : *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.031>
- Shanmugam, S. R., Adhikari, S., Wang, Z., & Shakya, R. (2017). Treatment of aqueous phase of bio-oil by granular activated carbon and evaluation of biogas production. *Bioresource Technology*, 223, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.008>
- Shen, Q. H., Gong, Y. P., Fang, W. Z., Bi, Z. C., Cheng, L. H., Xu, X. H., & Chen, H. L. (2015). Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency. *Bioresource Technology*, 193, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.050>
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z. J., Wu, Q., & Mao, E. (2009). Microalgae mass production methods. *Transactions of the ASABE*, 52(4), 1275–1287. <https://doi.org/10.1023/A:1012663213153>
- Shigeoka, T., Sato, Y., Takeda, Y., Yoshida, K., & Yamauchi, F. (1988). ACUTE TOXICITY OF CHLOROPHENOLS TO GREEN ALGAE , SELENASTRUM CAPRICORNUTUM AND STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7, 847–854.

- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Determination of ash in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Nrel/Tp-510-42622*, April 2005, 18. <https://doi.org/NREL/TP-510-42619>
- Stark, K., Plaza, E., & Hultman, B. (2006). Phosphorus release from ash , dried sludge and sludge residue from supercritical water oxidation by acid or base. *Chemosphere*, 62, 827–832. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.069>
- Stendahl, K. (2018). Phosphate recovery from sewage sludge in combination with supercritical water oxidation. *Water Science and Technology*, 48(1), 185–190.
- Suali, E., & Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316–4342. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.03.047>
- Talbot, C., Garcia-moscoso, J., Drake, H., Stuart, B. J., & Kumar, S. (2016). Cultivation of microalgae using fl ash hydrolysis nutrient recycle. *Algal Research*, 18, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.021>
- Tan, X., Meng, J., Tang, Z., Yang, L., & Zhang, W. (2020). Chemosphere Optimization of algae mixotrophic culture for nutrients recycling and biomass / lipids production in anaerobically digested waste sludge by various organic acids addition. *Chemosphere*, 244, 125509. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125509>
- Tantiphiphathana, M., Peng, L., Jitrwung, R., & Yoshikawa, K. (2015). Hydrothermal Treatment for Production of Aqueous Co-Product and Efficient Oil Extraction from Microalgae. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 9(5), 503–511.
- Taylor, P., Wang, Q., Lv, Y., Zhang, R., & Bi, J. (2013). Desalination and Water Treatment Treatment of cotton printing and dyeing wastewater by supercritical water oxidation. *Desalination and Water Treatment*, 51(12), 37–41. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.792164>
- Terry, K. L., & Raymond, L. P. (1985). System design for the autotrophic production of microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(10), 474–487. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90148-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90148-6)
- Teymouri, A., Barbera, E., Sforza, E., Morosinotto, T., Bertucco, A., & Kumar, S. (2016). Integration of Biofuels Intermediates Production and Nutrients Recycling in the Processing of a Marine Algae. *AIChE Journal*, 59(6), 663–667. <https://doi.org/10.1002/aic>
- Tian, C., Li, B., Liu, Z., Zhang, Y., & Lu, H. (2014). Hydrothermal liquefaction for algal

- biorefinery: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 933–950. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.030>
- Timmons, M. B., & Losordo, T. (1994). *Aquaculture water reuse systems : Engineering design and management*. Elsevier Science.
- Tommaso, G., Chen, W., Li, P., Schideman, L., & Zhang, Y. (2015). Chemical characterization and anaerobic biodegradability of hydrothermal liquefaction aqueous products from mixed-culture wastewater algae. *Bioresource Technology*, 178, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.011>
- Toor, S. S., Rosendahl, L., & Rudolf, A. (2011). Hydrothermal liquefaction of biomass: A review of subcritical water technologies. *Energy*, 36(5), 2328–2342. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2011.03.013>
- United Nations. (2000). United Nations Millennium Declaration: Resolution adapted by the General Assembly. *General Assembly, September, 9*. [http://www.un.org/en/events/pastevents/millennium\\_summit.shtml](http://www.un.org/en/events/pastevents/millennium_summit.shtml)
- UPME, & BID. (2015). *Integración de las energías renovables no convencionales en Colombia*. [http://www.upme.gov.co/Estudios/2015/Integracion\\_Energias\\_Renovables/INTEGRACION\\_ENERGIAS\\_RENOVANLES\\_WEB.pdf](http://www.upme.gov.co/Estudios/2015/Integracion_Energias_Renovables/INTEGRACION_ENERGIAS_RENOVANLES_WEB.pdf)
- Valdez, P. J., Dickinson, J. G., & Savage, P. E. (2011). Characterization of Product Fractions from Hydrothermal Liquefaction of *Nannochloropsis* sp . and the Influence of Solvents. *Energy and Fuels*, 25, 3235–3243.
- Valdez, P. J., Nelson, M. C., Wang, H. Y., Lin, X. N., & Savage, P. E. (2012). Hydrothermal liquefaction of *Nannochloropsis* sp.: Systematic study of process variables and analysis of the product fractions. *Biomass and Bioenergy*, 46, 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.08.009>
- Verma, A. K., Dash, R. R., & Bhunia, P. (2012). A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. *Journal of Environmental Management*, 93(1), 154–168. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.09.012>
- Wang, J., Zhou, W., Chen, H., Zhan, J., He, C., & Wang, Q. (2019). Ammonium Nitrogen Tolerant *Chlorella* Strain Screening and Its Damaging Effects on Photosynthesis. *Frontiers in Microbiology*, 9(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03250>

- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., & Ruan, R. (2010). Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>
- Widjaja, A., Chien, C. C., & Ju, Y. H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2008.07.007>
- Wiel, J. B. Vander, Mikulicz, J. D., Boysen, M. R., Hashemi, N., Kalgren, P., Nauman, L. M., Baetzold, S. J., Powell, G. G., & Nastaran, N. (2017). Characterization of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella protothecoides* using multi-pixel photon counters in a 3D focusing optofluidic system. *Royal Society of Chemistry Advances*, 4402–4408. <https://doi.org/10.1039/c6ra25837a>
- Wymer, P. E. O., & Thake, B. (1980). The Importance of Phosphorus in Microalgal Growth and Species Composition in Mixed Populations: Experiments and Simulations. *Proceedings of the Royal Society of London*, 209, 333–353. <https://doi.org/10.1098/rspb.1980.0099>
- Xu, C., & Lad, N. (2008). Production of Heavy Oils with High Caloric Values by Direct Liquefaction of Woody Biomass in Sub / Near-critical Water. *Energy and Fuels*, 22(10), 635–642.
- Xu, P., Janex, M. L., Savoye, P., Cockx, A., & Lazarova, V. (2002). Wastewater disinfection by ozone: Main parameters for process design. *Water Research*, 36(4), 1043–1055. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00298-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00298-6)
- Xu, Y., Zheng, X., Yu, H., & Hu, X. (2014). Hydrothermal liquefaction of *Chlorella pyrenoidosa* for bio-oil production over Ce/HZSM-5. *Bioresource Technology*, 156, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.010>
- Yang, B., Cheng, Z., Tang, Q., & Shen, Z. (2018). Nitrogen transformation of 41 organic compounds during SCWO: A study on TN degradation rate, N-containing species distribution and molecular characteristics. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.080>
- Yang, B., Cheng, Z., Yuan, T., & Shen, Z. (2018). Denitrification of ammonia and nitrate through supercritical water oxidation ( SCWO ): A study on the effect of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ratios, catalysts and auxiliary fuels. *The Journal of Supercritical Fluids*, 138(January), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.021>
- Yang, J. H., Shin, H. Y., Ryu, Y. J., & Lee, C. G. (2018). Hydrothermal liquefaction of

- Chlorella vulgaris: Effect of reaction temperature and time on energy recovery and nutrient recovery. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 68, 267–273.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.07.053>
- Yang, Y. F., Feng, C. P., Inamori, Y., & Maekawa, T. (2004). Analysis of energy conversion characteristics in liquefaction of algae. *Resources Conservation & Recycling*, 43, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2004.03.003>
- Yeh, K., & Chang, J. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105, 120–127.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.103>
- Yong, G., Ying, S., Loke, P., Tao, Y., & Lim, C. (2019). Reports Recent advances in algae biodiesel production : From upstream cultivation to downstream processing. *Bioresource Technology Reports*, 7(April), 100227.  
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100227>
- Yu, G, Zhang, Y., Schideman, L., Funk, T. L., & Wang, Z. (2011). Hydrothermal Liquefaction of Low Lipid Content Microalgae inot Biocrude Oil. *American Society of Agricultural Engineers*, 54(1), 239–246.
- Yu, Guo, Zhang, Y., Guo, B., Funk, T., & Schideman, L. (2014). Nutrient Flows and Quality of Bio-crude Oil Produced via Catalytic Hydrothermal Liquefaction of Low-Lipid Microalgae. *Bioenergy Research*, 7(4), 1317–1328.  
<https://doi.org/10.1007/s12155-014-9471-3>
- Yu, Guo, Zhang, Y., Schideman, L., Funk, T., & Wang, Z. (2011). Distributions of carbon and nitrogen in the products from hydrothermal liquefaction of low-lipid microalgae. *Energy and Environmental Science*, 4(11), 4587–4595.  
<https://doi.org/10.1039/c1ee01541a>
- Zhang, H., Zhang, X., & Ding, L. (2020). Partial oxidation of phenol in supercritical water with NaOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hydrogen production and polymer formation. *Science of the Total Environment*, 722, 137985. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137985>
- Zhang, L., Lu, H., Zhang, Y., Li, B., Liu, Z., & Duan, N. (2016). Nutrient recovery and biomass production by cultivating *Chlorella vulgaris* 1067 from four types of post-hydrothermal liquefaction wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1031–1039.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0640-3>
- Zhang, L., Lu, H., Zhang, Y., Li, B., Liu, Z., Duan, N., & Liu, M. (2016). Nutrient recovery

- and biomass production by cultivating *Chlorella vulgaris* 1067 from four types of post-hydrothermal liquefaction wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1031–1039. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0640-3>
- Zhu, Y., Albrecht, K. O., Elliott, D. C., Hallen, R. T., & Jones, S. B. (2013). Development of hydrothermal liquefaction and upgrading technologies for lipid-extracted algae conversion to liquid fuels. *Algal Research*, 2(4), 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.07.003>
- Zhu, Y., Bidy, M. J., Jones, S. B., Elliott, D. C., & Schmidt, A. J. (2014). Techno-economic analysis of liquid fuel production from woody biomass via hydrothermal liquefaction ( HTL ) and upgrading. *Applied Energy*, 129, 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.03.053>
- Zhu, Z., Rosendahl, L., Sohail, S., Yu, D., & Chen, G. (2015). Hydrothermal liquefaction of barley straw to bio-crude oil : Effects of reaction temperature and aqueous phase recirculation. *APPLIED ENERGY*, 137, 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.10.005>
- Zhuang, X., Zhan, H., Song, Y., He, C., Huang, Y., & Yin, X. (2019). Insights into the evolution of chemical structures in lignocellulose and non- lignocellulose biowastes during hydrothermal carbonization ( HTC ). *Fuel*, 236(June 2018), 960–974. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.09.019>
- Zimmermann, F. (1954). *Waste disposal* (Patent No. 2,665,249). United States Patent Office.
- Zou, S., Wu, Y., Yang, M., Li, C., & Tong, J. (2009). Thermochemical catalytic liquefaction of the marine microalgae *dunaliella tertiolecta* and characterization of bio-oils. *Energy and Fuels*, 23(7), 3753–3758. <https://doi.org/10.1021/ef9000105>