



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE RESIDUOS DE SEGUNDA GENERACIÓN A PARTIR DE
POSOS DE CAFÉ MEDIANTE CARBONIZACIÓN HIDROTHERMAL.
POSIBILIDADES DE USO AGRÍCOLA Y OTROS AVANCES PARA SU
APLICACIÓN EN UNA ESTRATEGIA DE ECONOMÍA CIRCULAR.**

TESIS DOCTORAL

Leslie Elizabeth Lara Ramos

2023

DIRECTORES:

Alejandro Fernández Arteaga

Gabriel Delgado Calvo-Flores

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Leslie Elisabeth Lara Ramos
ISBN: 978-84-1117-989-8
URI: <https://hdl.handle.net/10481/84431>

La doctoranda LESLIE ELIZABETH LARA RAMOS y los directores de la tesis ALEJANDRO FERNÁNDEZ ARTEAGA y GABRIEL DELGADO CALVO-FLORES, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 24 de abril de 2023

Directores de la Tesis

Fdo.: Alejandro Fernández Arteaga

Fdo.: Gabriel Delgado Calvo-Flores

Doctoranda

Fdo.: Leslie Elizabeth Lara Ramos

“Ya te lo he ordenado: ¡Sé fuerte y valiente! ¡No tengas miedo ni te desanimes! Porque el Señor tu Dios te acompañará dondequiera que vayas”.

Josué 1:9

“Porque no nos ha dado Dios espíritu de cobardía, sino de poder, de amor y de dominio propio”.

2 Timoteo 1:7

AGRADECIMIENTOS

A Dios, la piedra angular de mi vida, de lo que soy.

A mi familia por su apoyo y por siempre tratar de “estar” a pesar de la distancia. Un agradecimiento especial a mis padres, Holger y Patricia, y a mis hermanos, Sandy y Jonathan, quienes no se han cansado de escucharme y darme aliento.

A mis directores de tesis Alejandro Fernández Arteaga y Gabriel Delgado por haber visto en mí la capacidad de llevar a cabo este trabajo y buscar todas las maneras posibles de apoyarme, enseñarme, guiarme y motivarme desde el inicio de esta experiencia hasta ésta, su culminación.

A la familia Willems, mi “familia postiza” en Granada: Denny, Melissa, Samuel, Jairo, Malaquías y mi pequeño Zachy, quienes me han abierto las puertas de su corazón, de su hogar y me han hecho parte de sus vidas. Su apoyo espiritual y emocional ha sido fundamental.

A todo el departamento de Edafología y Química Agrícola por el recibimiento cálido desde el primer día, cuando empecé el TFM. Su buena acogida también formó parte de la decisión de dar este paso. En especial, la apertura y sinceridad de Gabriel que, aunque no me considere apta para su “kon-tiki”, he llegado a tenerle un aprecio muy grande como amigo. Siempre he creído que el ambiente de trabajo es un factor esencial.

Y, por último, pero no menos importantes, a otras personas que han pasado por mi vida (amigo/as, compañera/os de piso, compañero/as de laboratorio) y profesores (Departamentos de Ingeniería Química y Nutrición y Bromatología) que también han jugado un papel importante en algún determinado momento durante este proceso de crecimiento personal y profesional. Es complicado enlistarlos a todos, pero les haré llegar mi profundo agradecimiento. Sin “personajes secundarios” no hay película.

“GRACIAS TOTALES”

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	11
GRAPHICAL ABSTRACT	13
ÍNDICE DE TABLAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	17
ABREVIATURAS	21
1. Introducción.....	23
1.1. El café y los posos de café. Aspectos generales.....	25
Origen y distribución del café	25
Posos de café	26
Composición de los posos de café.....	27
1.2. Economía circular.....	30
Generalidades	30
Residuos agroalimentarios.....	32
Revalorización de los posos de café.....	33
1.3. Carbonización hidrotermal como estrategia de reutilización de los posos de café	35
Carbonización hidrotermal.....	35
Ventajas de la HTC sobre otros procesos de transformación térmica	36
Uso de hidrochars en el suelo.....	38
Principales aplicaciones de los hidrochars de posos de café.....	39
1.4. Hambre oculta y biofortificación	40
Hambre oculta	40
Biofortificación agronómica.....	41

Biofortificación agronómica de zinc y hierro	42
Posos de café como agentes biofortificadores	43
2. Objetivos	45
3. Materiales y Métodos.....	49
3.1. Materiales	51
3.1.1. Posos de café	51
3.1.2. Suelos	51
3.1.3. Planta para ensayo	53
3.2. Métodos analíticos.....	53
3.2.1. Carbonización Hidrotermal (HTC).....	53
3.2.2. Métodos de caracterización de los posos de café y sus hidrochars.....	55
3.2.3. Métodos de análisis de los licores de HTC de los posos de café	60
3.2.4. Métodos de transformación aplicados a los hidrochars	61
3.2.5. Métodos de análisis de suelos	62
3.2.6. Métodos de análisis de las plantas.....	64
3.2.7. Evaluación de la biofortificación.....	64
3.2.8. Análisis estadístico	65
3.3. Diseños experimentales	66
3.3.1. Ensayo 1. Efecto de los parámetros de HTC sobre las propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de los hidrochars de SCG.....	66
3.3.2. Ensayo 2. Influencia de la temperatura en la composición de los residuos resultantes de la carbonización hidrotermal.	67
3.3.3. Ensayo 3. Impacto de la aplicación de dos pretratamientos en la detoxificación y mejora estructural de los hidrochars de posos de café.	68
3.3.4. Ensayo 4. Activación química de los hidrochars de posos de café para la mejora de su funcionalidad como bio-quelatos agrícolas.	68

3.3.5. Ensayo 5. Evaluación de la aplicación de los hidrochars de posos de café como enmienda orgánica de suelos agrícolas.....	69
3.3.6. Ensayo 6. Efectos de la adición de los hidrochars de posos de café funcionalizados con Zn y Fe (bio-quelatos) para la biofortificación agronómica de plantas comestibles	69
3.3.7. Ensayo 7. Uso de los SCG y sus hidrochars activados y funcionalizados como bio-quelatos para la biofortificación agronómica de Fe y Zn.....	72
4. Resultados y Discusión.....	75
Esquema de organización del capítulo de resultados y discusión.....	77
4.1. Efecto de los parámetros de HTC sobre las propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de los hidrochars de SCG.....	79
4.2. Influencia de la temperatura en la composición de los residuos resultantes de la carbonización hidrotermal.	86
4.2.1. Residuo sólido.....	86
4.2.2. Residuo líquido.....	92
4.3. Impacto de la aplicación de dos pretratamientos en la detoxificación y mejora estructural de los hidrochars de posos de café.	100
4.4. Activación química de los hidrochars de posos de café para la mejora de su funcionalidad como bio-quelatos agrícolas.	108
4.4.1. Modificaciones de los bio-productos con la activación.....	108
4.4.2. Funcionalización de los bio-productos para la generación de bio-quelatos	117
4.5. Evaluación de la aplicación de los hidrochars de posos de café como enmienda orgánica de suelos agrícolas.	121
4.5.1. Efectos sobre la fertilidad del suelo	122
4.5.2. Efectos en planta.....	123
4.6. Efectos de la adición de los hidrochars de posos de café funcionalizados con Zn y Fe (bio-quelatos) para la biofortificación agronómica de plantas comestibles.....	131

4.6.1. Efectos sobre el suelo	131
4.6.2. Efectos sobre el crecimiento de las plantas	134
4.6.3. Biofortificación agronómica de Zn y Fe. Parámetros de evaluación.....	137
4.6.4. Estudio de la relación entre las variables de suelo y planta ensayadas.....	141
4.7. Uso de los SCG y sus hidrochars activados y funcionalizados como bio-quelatos para la biofortificación agronómica de Fe.....	145
4.7.1. Fe.....	145
4.7.2. Zn.....	155
5. Conclusiones	163
6. Bibliografía	169
7. Anexos	189
Anexo I. Pruebas de biofortificación en invernadero.....	191
Anexo II. Propuesta de biorrefinería	195

RESUMEN

Los posos de café (SCG) son un residuo de la industria agroalimentaria generado en grandes cantidades a nivel mundial. Su rica composición en fibra [62%, celulosa, hemicelulosa, lignina], grasa (13-18%), proteínas (14-17%) y cenizas (1.3%) hace de este residuo un material con potencial químico y biotecnológico que puede ser aprovechado dentro de un concepto de economía circular. Sin embargo, su alto contenido en compuestos tóxicos ha dificultado su uso en el campo agrícola. El objetivo de este trabajo ha sido enfocar la revalorización de los SCG mediante la carbonización hidrotermal (HTC) como proceso de transformación principal y, a partir de los subproductos generados (hidrochar y licor), explorar las posibles aplicaciones basadas en su caracterización; esto con mayor énfasis en el hidrochar. La HTC generó hidrochars con propiedades diferentes a los SCG. Se obtuvo productos sólidos de segunda generación con mayor cantidad de C fijado, N, H, relación C/N, superficie específica y polifenoles totales. Por el contrario, otras propiedades se vieron reducidas: pH, CE₂₅, P y K asimilables, tamaño de partícula, materia volátil y cenizas. La aplicación de un proceso de desgrasado, combinado o no, con un lavado con etanol previo a la HTC no tuvo un impacto en la reducción significativa ($p < 0.05$) del contenido de polifenoles totales ni en la mejora de la estructura de las partículas, pero podrían ser utilizados con otros fines de explotación. Por otro lado, el análisis de los licores de HTC mostró una composición mayoritaria en azúcares reductores, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y otros compuestos de carácter tóxico. Las características y propiedades de ambos subproductos de la HTC se vieron altamente influenciadas (se acentúan) por la temperatura aplicada en el proceso.

Para las distintas aplicaciones de los hidrochars de SCG en el campo agrícola, se utilizó como referencia un suelo de cultivo mediterráneo y plantas de lechuga (*Lactuca sativa* var. *longifolia*). La evaluación de dos de estos bio-productos (H175, H185) como enmienda orgánica de suelos a dosis de 1% y 2.5% dio como resultado una ligera mejora en las propiedades fisicoquímicas del suelo pero que no fue significativa respecto a los SCG. Destacó el aporte de carbono orgánico y la movilización de elementos nutrientes

con el aumento de la dosis, sin embargo, se evidenció una limitación de la biomasa incluso a la dosis más baja (1%) debido al mayor carácter fitotóxico de los hidrochars respecto a los SCG.

En base a la capacidad movilizadora de elementos en el suelo, se realizó una primera evaluación de estos bio-productos como agentes de biofortificación mediante la funcionalización de dos hidrochars (H160, H200) con Zn y Fe. Los resultados revelaron que existe un mejor equilibrio entre el incremento del contenido mineral y el crecimiento de la planta cuando los bio-quelatos son aplicados al suelo en dosis fijas (0.5%) en comparación con dosis variadas que dependen de una concentración mineral establecida. A pesar de que todavía se observó un cierto grado de fitotoxicidad, los contenidos de Zn y Fe en planta aumentaron hasta en un 90% (H160-Zn) y 288% (H200-Fe), respectivamente, en comparación con lechugas no biofortificadas.

Posteriormente la activación de los hidrochars previo a su funcionalización, provocó un aumento de la capacidad de adsorción de Zn (758%, H160) y Fe (230%, H160) al mismo tiempo que una reducción del contenido de polifenoles totales (46-73%). Este hecho permitió reducir la dosis ensayada para efectos de biofortificación (0.2%) obteniendo como resultado una supresión total de la fitotoxicidad. Los contenidos tanto de Zn como de Fe se triplicaron en comparación con lechugas no biofortificadas. Este efecto se vio reflejado de manera proporcional también en el porcentaje de ingesta diaria recomendada (IDR) de cada micronutriente. Por último, en todos los ensayos de biofortificación realizados, se evidenció la creación de una reserva mineral en el suelo que podría ser utilizada en futuros ciclos de cultivos.

En términos generales, los hidrochars de SCG exhibieron un gran potencial para ser utilizados en el campo agrícola como agentes de biofortificación; esto siempre y cuando sean utilizados en dosis subtóxicas ($\leq 0.2\%$) y pasen por un proceso de activación previo que garantice un buen aporte del micronutriente ensayado. Los licores también mostraron un atractivo potencial de fermentación para la obtención de compuestos de alto valor biológico. Las técnicas ensayadas en esta tesis doctoral están sujetas a ensayos de optimización y/o modificación con el fin de obtener el mejor aprovechamiento.

ABSTRACT

Spent coffee grounds (SCG) are a residue of the agri-food industry generated in large quantities worldwide. Its rich composition in fiber [62%, cellulose, hemicellulose, lignin], fat (13-18%), protein (14-17%) and ash (1.3%) makes this residue a material with chemical and biotechnological potential that can be used within a concept of circular economy. However, its high content of toxic compounds has made its use in the agricultural field difficult. The objective of this work has been to focus on the revaluation of SCG through hydrothermal carbonization (HTC) as the main transformation process and, from the by-products generated (hydrochar and liquor), explore the possible applications based on their characterization; this with greater emphasis on the hydrochar. The HTC generated hydrochars with different properties than the SCG. Second generation solid products with a higher amount of fixed C, N, H, C/N ratio, specific surface area and total polyphenols were obtained. On the contrary, other properties were reduced: pH, EC₂₅, assimilable P and K, particle size, volatile matter, and ashes. The application of a defatting process combined or not with an ethanol wash prior to HTC did not have an impact on the significant reduction ($p < 0.05$) of the total polyphenol content or on the improvement of the particles structure. but they could be used for other exploitation purposes. On the other hand, the analysis of the HTC liquors showed a majority composition of reducing sugars, short-chain fatty acids (SCFA) and other toxic compounds. The characteristics and properties of both HTC by-products were highly influenced (they are accentuated) by the temperature applied in the process.

For the different applications of SCG hydrochars in the agricultural field, a Mediterranean cultivated soil and lettuce plants (*Lactuca sativa* var. *longifolia*) were used as reference. The evaluation of two of these bio-products (H175, H185) as organic soil amendment at doses of 1% and 2.5% resulted in a slight improvement in the physicochemical properties of the soil, but it was not significant with respect to the SCG. The contribution of organic carbon and the mobilization of nutrient elements with the increase of the dose stood out, however, a limitation of the biomass was evidenced even

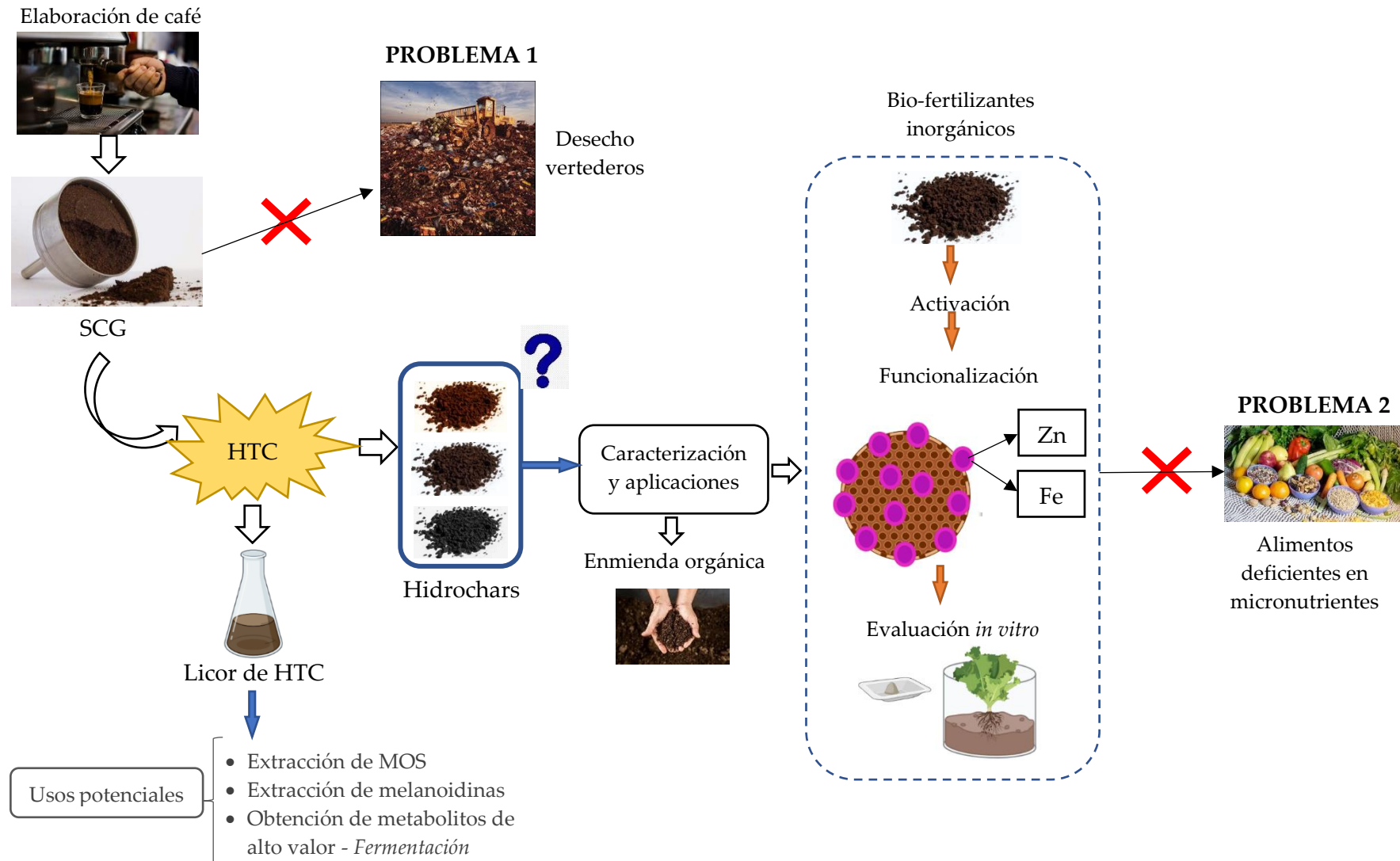
at the lowest dose (1%) due to the greater phytotoxic nature of the hydrochars with respect to the SCG.

Based on the mobilizing capacity of elements in the soil, a first evaluation of these bio-products as biofortification agents was carried out through the functionalization of two hydrochars (H160, H200) with Zn and Fe. The results revealed that there is a better balance between the increase of mineral content and plant growth when bio-chelates are applied to the soil in fixed doses (0.5%) compared to varied doses that depend on an established mineral concentration. Although a certain degree of phytotoxicity was still observed, plant Zn and Fe contents increased by up to 90% (H160-Zn) and 288% (H200-Fe), respectively, compared to non-biofortified lettuces.

Subsequently, the activation of the hydrochars prior to their functionalization, caused an increase in the adsorption capacity of Zn (758%, H160) and Fe (230%, H160) and at the same time a reduction of the content of total polyphenols (46-73%). This fact made it possible to reduce the dose tested for biofortification effects (0.2%), obtaining as a result a total suppression of phytotoxicity. Both Zn and Fe contents tripled compared to non-biofortified lettuces. This effect was also proportionally reflected in the percentage of recommended daily intake (RDI) of each micronutrient. Finally, in all the biofortification tests carried out, the creation of a mineral reserve in the soil that could be used in future crop cycles was evidenced.

In general terms, SCG hydrochars exhibited great potential to be used in the agricultural field as biofortification agents as long as they are used in subtoxic doses ($\leq 0.2\%$) and go through a prior activation process that guarantees a good contribution of the tested micronutrient. The liquors also showed attractive fermentation potential for the obtention of high biological value compounds. The techniques tested in this doctoral thesis are subject to optimization and/or modification tests in order to obtain the best use and yield.

GRAPHICAL ABSTRACT



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química y nutricional de los posos de café (Ballesteros, et al., 2014).	28
Tabla 2. Composición mineral de los posos de café (Mussatto, et al., 2011).	29
Tabla 3. Ejemplos de algunos compuestos bioactivos obtenidos a partir de diferentes tratamientos aplicados a los SCG.	34
Tabla 4. Efecto de la temperatura y tiempo de residencia de la HTC de varias materias primas sobre el rendimiento y el contenido elemental de los hidrochars (Shafei, 2023).	36
Tabla 5. Ventajas y limitaciones de los diferentes métodos para la biofortificación agronómica (Praharaj, et al., 2021).	41
Tabla 6. Propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de los suelos 1 y 2 utilizados.	52
Tabla 7. Condiciones de temperatura y presión establecidas para la HTC.	66
Tabla 8. Diseño experimental de los tratamientos aplicados a los SCG previo a la HTC.	68
Tabla 9. Contenido de Zn y Fe asimilables de los SCG y los hidrochars funcionalizados, utilizados en el ensayo de biofortificación.	70
Tabla 10. Concentración de micronutrientes y cantidad de bio-producto añadido en cada tratamiento.	71
Tabla 11. Contenido de Zn y Fe asimilables de los SCG y los hidrochars funcionalizados, utilizados en el ensayo de biofortificación.	72
Tabla 12. Propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de los SCG e hidrochars a diferentes temperaturas.	81
Tabla 13. Valores de superficie específica de los SCG e hidrochars H2 y H4.	84
Tabla 14. Propiedades químicas y fisicoquímicas de los SCG y los hidrochars obtenidos a diferentes temperaturas de HTC.	91
Tabla 15. Análisis de composición proximal de los licores de HTC de SCG a diferentes temperaturas, expresados como porcentajes (%) en base de 100 g o 100 ml.	93
Tabla 16. Perfil lipídico de los SCG y de los hidrochars obtenidos a 160 °C a partir de SCG previamente tratados, expresado en % de ácido graso (AG) como media $\pm$ SD (n=3).	105

Tabla 17. Valores de integración para los principales dominios orgánicos de tipo C en los espectros de ¹³ C-CPMAS-NMR de los hidrochars sin y con activación.....	110
Tabla 18. Índices estructurales de los bio-productos activados y no activados.....	111
Tabla 19. Superficie específica BET de los bio-productos antes y después de la activación química.	113
Tabla 20. Características fisicoquímicas y contenido de polifenoles totales de los bio-productos activados.	116
Tabla 21. Contenido de Zn y Fe de los bio-productos en ausencia y/o presencia de activación y una posterior funcionalización.....	119
Tabla 22. Efectos de los SCG y sus hidrochars obtenidos a diferentes temperaturas sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo después de 40 días de cultivo. ..	123
Tabla 23. Efecto de los SCG y sus hidrochars a diferentes temperaturas sobre el contenido de macro y micronutrientes de las lechugas en un período de 40 días de cultivo.	128
Tabla 24. Efectos de los SCG, los hidrochars de SCG y sus bio-quelatos sobre las propiedades del suelo después de 40 días de cultivo.	133
Tabla 25. Contenido mineral en suelo y planta y parámetros de evaluación de la eficiencia.	140
Tabla 26. Coeficientes de correlación de los parámetros analizados en el ensayo Zn-1.	143
Tabla 27. Coeficientes de correlación de los parámetros analizados en el ensayo Zn-2.	143
Tabla 28. Coeficientes de correlación de los parámetros analizados en el ensayo Fe-1.	143
Tabla 29. Coeficientes de correlación de los parámetros analizados en el ensayo Fe-2.	144
Tabla 30. Efectos sobre las propiedades del suelo de los bio-quelatos activados después de 40 días de cultivo.....	146
Tabla 31. Balance del Fe y parámetros de evaluación en el sistema suelo-planta.	152
Tabla 32. Aporte dietético nutricional de Fe de las lechugas por tratamiento.....	153
Tabla 33. Aporte dietético nutricional de Zn de las lechugas por tratamiento.....	160

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes estructurales de un grano de cafeto (Manals-Cutiño, et al., 2018).....	25
Figura 2. Volumen de café consumido a nivel mundial entre 2012 y 2021 (en millones de sacos de 60 kg) (ICO, 2021).	27
Figura 3. Modelo de economía circular (UNIDO, 2020).	31
Figura 4. Cadenas de valor integradas y etapas de una biorrefinería (López, 2020).....	33
Figura 5. Esquema de generación de productos de la carbonización hidrotermal de un residuo lignocelulósico.	37
Figura 6. <i>Lactuca sativa</i> var. <i>longifolia</i> de 30 días de edad utilizada en los ensayos.	53
Figura 7. Reactor en discontinuo Highpreactor™ (BR-300, Berghof Ltd, Alemania) con (A) agitador, (B) válvula para salida/entrada de gas, (C) camisa de calor, (D) sistema acoplado para toma de muestras, (E) manómetro y (F) orificio para sensor de temperatura.....	54
Figura 8. A) Termómetro utilizado para el control de la temperatura en el reactor, y B) Sistema de agitación acoplado.....	55
Figura 9. Análisis empleados para la caracterización de los residuos sólido y líquido resultantes de la HTC a diferentes temperaturas.	67
Figura 10. Esquema general de los ensayos de cultivo <i>in vitro</i>	74
Figura 11. Distribución del tamaño de partícula de los SCG e hidrochars lavados obtenidos a diferentes condiciones de temperatura y presión.	83
Figura 12. Imágenes SEM de partículas de A) SCG y, B) hidrochar obtenido a 185 °C (H5).....	85
Figura 13. Imágenes SEM de partículas de A) SCG, B) hidrochar obtenido a 160 °C (H160), C) hidrochar obtenido a 180 °C (H180) y, D) hidrochar obtenido a 200 °C (H200).	87
Figura 14. Imágenes SEM de partículas de A) H160 en el que se observan poros con paredes de aproximadamente 7-8 µm de grosor, y B) H200 con paredes de entre 3-4 µm de grosor. Se observa a detalle distinta porosidad: poros rellenos (PR) con material de degradación y poros en formación (PF).	88
Figura 15. Rendimiento de los hidrochars obtenidos a diferentes temperaturas de HTC.	89

Figura 16. Efectos físicos sucesivos y consecuentes producidos por el aumento de la temperatura de HTC.....	89
Figura 17. Contenido de azúcares totales (AT) de los licores de HTC de SCG obtenidos a diferentes temperaturas. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=3$). Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).....	94
Figura 18. Contenido de a) hidroximetilfurfurales (HMF), b) furfurales, c) polifenoles totales (PT) y d) ácidos grasos de cadena corta (AGCC), expresados en g/L, de los licores de HTC de SCG obtenidos a diferentes temperaturas.	96
Figura 19. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) de los licores resultantes de la HTC de los SCG, obtenidos a diferentes temperaturas.....	98
Figura 20. Contenido de polifenoles totales (PT) y materia grasa (MG) en los hidrochars obtenidos a 160 °C a partir de SCG previamente tratados. Nomenclatura de los residuos detallada en la (Tabla 8). Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=3$). Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las columnas sin ninguna letra no mostraron diferencias significativas.....	102
Figura 21. Imágenes SEM de los hidrochars obtenidos a 160 °C a partir de SCG tratados previamente. Dos imágenes por caso, la primera corresponde a la partícula entera y la segunda al detalle de su superficie. En parejas: A) y B) hidrochar desgrasado (residuo D); C) y D) hidrochar lavado (residuo L); E) y F) hidrochar desgrasado y lavado (residuo D-L); G) y H) hidrochar lavado y desgrasado (L-D).	106
Figura 22. Espectros de ^{13}C -CPMAS-NMR en estado sólido de los SCG, sus hidrochars antes y después de la activación con NaOH. A) SCG, B) ASCG, C) H160, D) AH160, E) H180, F) AH180, G) H200, H) AH200.....	109
Figura 23. Imágenes SEM de los bio-productos antes y después de la activación química. A) SCG, B) SCG activado, C) H160, D) AH160, E) H180, F) AH180, G) H200, H) AH200.	114
Figura 24. Rendimiento de la activación química de los hidrochars obtenidos a diferentes temperaturas de HTC.	115
Figura 25. Fotos aéreas de las lechugas cultivadas con las diferentes enmiendas y dosis ensayadas, tras un periodo de 40 días de cultivo.	125

Figura 26. A) Peso fresco y B) peso seco de las lechugas después de un período de 40 días de cultivo. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). 126

Figura 27. Peso fresco (PF) y peso seco (PS) de las lechugas después de 40 días de cultivo. A) Ensayo de Zn; B) Ensayo de Fe. Diferentes números en las muestras indican el ensayo: (1) bio-quelados a 10 mg de mineral por kg de suelo; (2) 0.5% de bio-producto. Control: solo NPK; Control-Zn/Control-Fe: quelato comercial + NPK; SCG: posos de café; H160: hidrochar obtenido a 160 °C; H200: hidrochar obtenido a 200 °C; SCG-Zn o Fe: bio-quelatos de SCG; H160-Zn/Fe: bio-quelatos de H160; H200-Zn/Fe: bio-quelatos de H200. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=3$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en PF mientras que letras minúsculas lo hacen en PS. 136

Figura 28. Gráficos superpuestos de puntajes de PCA obtenidos para los tratamientos (PC2 vs PC1) y los parámetros de suelo y planta. A) Ensayo de Zn con bio-quelatos a 10 mg/kg de suelo; B) Ensayo Zn al 0.5% del bio-producto; C) Ensayo Fe con bio-quelatos a 10 mg/kg de suelo; D) Ensayo Fe al 0.5% de bio-producto. Control: solo NPK; Control-Zn/Fe: quelato comercial + NPK; SCG: posos de café; H160: hidrochar obtenido a 160 °C; H200: hidrochar obtenido a 200 °C; SCG-Zn/Fe: bio-quelatos de SCG; H160-Zn/Fe: bio-quelatos de H160; H200-Zn/Fe: bio-quelatos de H200; CO: carbono orgánico; X_P: contenido de micronutriente en la planta; X_S: micronutriente disponible en el suelo; PF: peso fresco; PS: peso seco; CE₂₅: conductividad eléctrica medida a 25 °C. 142

Figura 29. Imágenes de lechugas de cada tratamiento después de 40 días de cultivo. a) Control; b) Control-Fe; c) ASCG-Zn; d) AH160-Zn; e) AH180-Zn; f) AH200-Zn. Las imágenes fueron grabadas simultáneamente. Se seleccionó la mejor réplica de los tratamientos para tomar fotografías (planos axial y cenital) de las cuatro réplicas. 147

Figura 30. Peso fresco (PF) y peso seco (PS) de las lechugas después de 40 días de cultivo. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n= 4$). Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las columnas sin ninguna letra no mostraron diferencias significativas..... 147

Figura 31. Contenido de Fe y otros micronutrientes expresados en función del peso fresco de la parte comestible de la lechuga en los diferentes tratamientos. Las barras

representan las desviaciones estándar de las medias ($n=4$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en contenido de Fe, letras minúsculas en contenido de Zn, letras mayúsculas en cursiva en Mn y letras minúsculas en cursiva en Cu. 149

Figura 32. Imágenes de lechuga de cada tratamiento después de 40 días de cultivo. a) Control; b) Control-Zn; c) ASCG-Zn; d) AH160-Zn; e) AH180-Zn; f) AH200-Zn. Las fotografías fueron tomadas simultáneamente (planos axial y cenital) de las cuatro réplicas. Se seleccionó uno por tratamiento. 156

Figura 33. Peso fresco (PF) y peso seco (PS) de las lechugas después de 40 días de cultivo. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=4$). Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las columnas sin ninguna letra no mostraron diferencias significativas..... 157

Figura 34. Contenido de A) Zn, B) Fe y C) Mn expresados en función del peso fresco de la parte comestible de la lechuga en los diferentes tratamientos. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=4$). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)..... 158

ABREVIATURAS

A/AO: ratio alquilo

AH160: hidrochar de posos de café obtenido a 160 °C activado

AH180: hidrochar de posos de café obtenido a 180 °C activado

AH200: hidrochar de posos de café obtenido a 200 °C activado

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

ARM: aromaticidad

ASCG: posos de café activados

AT: azúcares totales

C/N: relación carbono-nitrógeno

CaCO₃ eq.: carbonato cálcico equivalente

CE₂₅: conductividad eléctrica medida a 25 °C

CO: carbono orgánico

Cu: coeficiente de uniformidad

ERD: eficiencia de reserva disponible

EU: eficiencia de utilización

FT: factor de transferencia

GAE (gallic acid equivalent): ácido gálico equivalente

HB/HI: hidrofobicidad

H160: hidrochar de posos de café obtenido a 160 °C

H180: hidrochar de posos de café obtenido a 180 °C

H200: hidrochar de posos de café obtenido a 200 °C

HTC (hydrothermal carbonization): carbonización hidrotermal

LR (lignin ratio): ratio de lignina

MG: materia grasa

MO: Materia orgánica

MOS: manooligosacáridos

N: nitrógeno total

PF: peso fresco

PS: peso seco

PT: polifenoles totales

SCG (spent coffee grounds): posos de café

SE: superficie específica

SEM (scanning electron microscope): microscopio electrónico de barrido

W₃₃: retención de agua a -33 kPa

W₁₅₀₀: retención de agua -1500 kPa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El café y los posos de café. Aspectos generales

Origen y distribución del café

El origen del café es todavía incierto, sin embargo, la mayoría de las fuentes apuntan a que su cultivo empezó en Etiopía. El popular grano proviene del cafeto, planta conocida científicamente como *Coffea spp.*, y son dos variedades las que se comercializan principalmente: *C. arabica* y *C. robusta*. La primera es la más demandada por su aromaticidad y suavidad mientras que la segunda tiene un sabor más fuerte y amargo por su más alto contenido en cafeína (Arabo, 2021). La variedad *arabica* representa el 75% de la producción mundial y es producida principalmente en Brasil, Colombia y Kenia. Por otro lado, la variedad *robusta* representa el 25% restante de la producción mundial y procede en su mayoría de Angola, Uganda y Costa de Marfil (Haro García, 2019).

El fruto del cafeto es una drupa con dos nueces y una pulpa azucarada, consta de diferentes partes estructurales que se visualizan en la **Figura 1**.



Figura 1. Partes estructurales de un grano de cafeto (Manals-Cutiño, et al., 2018).

La forma de preparación de la bebida, así como los hábitos de consumo, varían mucho en función de cada país. Generalmente el proceso empieza por el despulpado, seguido del tueste que es la etapa en la cual el grano verde obtiene todas las características organolépticas que lo hacen tan apetecible debido a los cambios químicos producidos. Una vez fríos, estos se muelen y se empaican para su comercialización (Coffenza, 2019).

Actualmente, el café es la bebida más consumida a nivel mundial y el segundo producto más comercializado después del petróleo. Está ampliamente distribuido por los 5 continentes y se estima que alrededor de 10.000 millones de kilos de café se producen y consumen cada año (ICO, 2021). El país que registra la mayor producción y exportación del producto es Brasil, seguido por Colombia. Por otro lado, Estados Unidos es el mayor importador, pero no el mayor consumidor.

A lo largo del tiempo y por el constante aumento del consumo en la población, se ha cuestionado mucho las propiedades nutritivas y estimulantes del café debido a la composición. Según expertos en nutrición, el café no tiene valor nutricional alguno, pues proporciona escasas proteínas, grasas e hidratos de carbono (Haro García, 2019). Sin embargo, su composición incluye gran variedad de compuestos antioxidantes como ácido clorogénico, diterpenos y melanoidinas (Godos, et al., 2014).

Posos de café

Los posos de café, también conocidos como “spent coffee grounds” (SCG) en inglés, se definen como el residuo biológico obtenido durante la producción de bebidas de café y/o la producción industrial de café instantáneo en polvo (Cervera Mata, et al., 2019). Este desecho de la industria y la hostelería se genera en grandes cantidades anualmente. Para visualizar mejor la generación de los posos de café, es necesario revisar el consumo de este producto debido a su relación directa. Según la Organización Internacional del Café (2021), el consumo de café en sus distintas formas ronda actualmente los 166.35 millones de sacos de 60 kg anuales (**Figura 2**), de los cuales, 54.07 millones corresponden a Europa.

En España, en el año 2020 se registró un consumo de café de 151 mil toneladas (AECafé, 2021). Esta cifra puede traducirse en la generación local de la misma cantidad de posos de café.

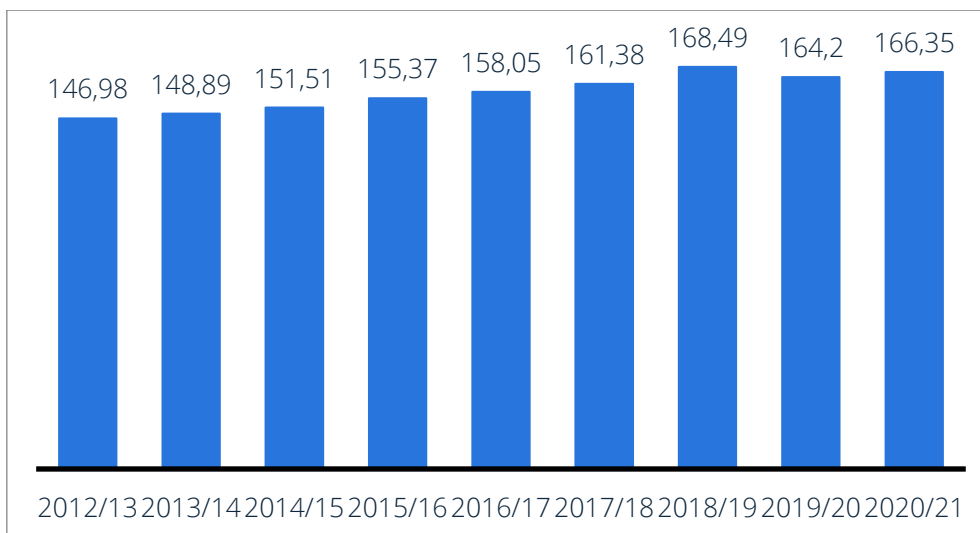


Figura 2. Volumen de café consumido a nivel mundial entre 2012 y 2021 (en millones de sacos de 60 kg) (ICO, 2021).

Composición de los posos de café

Los posos de café no fueron estudiados sino a partir del año 1973. A partir de ese tiempo, el número de artículos publicados se ha incrementado considerablemente, de tal manera que más del 50% de estos corresponden a la última década (Campos-Vega, et al., 2015). La composición de este residuo es la base de la comprensión de su gestión y aprovechamiento, como se verá más adelante.

Los SCG han sido caracterizados química y nutricionalmente, encontrándose una cantidad significativa de compuestos antioxidantes que en su gran mayoría son compuestos fenólicos como la cafeína y el ácido clorogénico. Contienen una baja cantidad de lípidos y proteínas, pero, por el contrario, son altos en fibra, en donde la de tipo insoluble es 5 veces más alta que la soluble. Cabe señalar que la composición de este residuo presenta gran variabilidad debido a factores como el método de preparación de la bebida, las condiciones de cultivo y la variedad del café (Pérez-Burillo, et al., 2022); a pesar de esto, la mayoría de SCG presentan similar composición. Un resumen de esta composición general descrita por Ballesteros et al. (2014) se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición química y nutricional de los posos de café (Ballesteros, et al., 2014).

Componente	Contenido (g/100 g peso seco)
Celulosa	12.40 ± 0.79
Hemicelulosa	39.10 ± 1.94
Arabinosa	3.60 ± 0.52
Manosa	19.07 ± 0.85
Galactosa	16.43 ± 1.66
Lignina	23.90 ± 1.70
Insoluble	17.59 ± 1.56
Soluble	6.31 ± 0.37
Cenizas	1.3 ± 0.10
Proteína	17.44 ± 0.10
Fibra total dietética	60.46 ± 2.19
Insoluble	50.78 ± 1.58
Soluble	9.68 ± 2.70

Carbohidratos

Los polisacáridos son el componente principal de los posos de café, más específicamente la hemicelulosa y celulosa, que se combinan para constituir alrededor del 50% del peso seco total de los SCG (McNutt & He, 2019). Los azúcares que se polimerizan para formar la hemicelulosa de este residuo son en su mayoría monómeros de manosa. La abundancia de los azúcares se distribuye de la siguiente manera: manosa 37.03%, galactosa 31.90%, glucosa 24.08%, arabinosa 6.99%, y no contiene xilosa. La celulosa está compuesta principalmente por glucosa (Ballesteros, et al., 2014).

El siguiente compuesto más abundante es la lignina que representa alrededor del 20% del peso seco (McNutt & He, 2019). Los ácidos clorogénico, cafeico y cumárico son los componentes más importantes de la lignina en los SCG. Dichos compuestos juegan un papel importante en la salud debido a sus propiedades antioxidantes (Ballesteros, et al., 2014).

Lípidos

Los posos de café también contienen una cantidad considerable de grasa, aproximadamente un 15% de su composición (McNutt & He, 2019). El perfil de ácidos grasos de los lípidos extraídos presenta un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (46.5%), predominantemente de ácido linoleico (45.0%). Existe también una fracción de ácidos grasos saturados, siendo el palmítico el más prevalente (34.9%).

Proteínas

Las proteínas representan alrededor del 14% de su peso seco. La proteína de SCG tiene un alto contenido de aminoácidos esenciales de cadena ramificada (BCAA), comparable a la proteína de soja. Los aminoácidos esenciales comprenden casi la mitad (49%) de los aminoácidos totales, principalmente la leucina, que contribuye con el 13 o el 21% del contenido total. En general, los aminoácidos más abundantes son el ácido glutámico, la leucina, la glicina, la valina y la fenilalanina (Campos-Vega, et al., 2015).

Minerales

Una variedad de elementos minerales se encuentra constituyendo la fracción de cenizas (1.6%) de los SCG. El contenido mineral del residuo se detalla en la **Tabla 2**. El potasio es el elemento mineral más abundante, seguido por el fósforo y el magnesio (Ballesteros, et al., 2014).

Tabla 2. Composición mineral de los posos de café (Mussatto, et al., 2011).

Minerales	mg/kg
Potasio	3549.0
Fósforo	1475.1
Magnesio	1293.3
Calcio	777.4
Aluminio	297.3
Hierro	118.7
Manganeso	40.1
Cobre	32.3
Zinc	15.1
Azufre	n.d
Cromo	n.d

n.d. no detectado

Otros compuestos de interés

Otros componentes minoritarios presentes en los posos de café son los compuestos nitrogenados no proteicos, estos son: aminoácidos libres, péptidos de cadena corta y alcaloides, especialmente la cafeína y la trigonelina (Campos-Vega, et al., 2015). Además, los compuestos fenólicos, principalmente los taninos, representan el 0.25% de la composición de este residuo (Gemechu, 2020). Su elevado peso molecular y su capacidad quelante los distinguen de los de la planta. Los ácidos clorogénicos son los compuestos más abundantes de este grupo (Campos-Vega, et al., 2015), se incluyen: los ácidos cafeoilquínico (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA), dicafeoilquínico (3,4diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA), cafeico, ferúlico, p-cumárico, sinápico y 4-hidroxibenzoico (Monente, et al., 2015). Estos compuestos tienen una relevante importancia ya que son los que le confieren gran parte de la capacidad antioxidante a este producto (Ballesteros, et al., 2017) y despiertan interés para diferentes aplicaciones en la industria. También juegan un papel determinante en la fitotoxicidad de los SCG (Pérez-Burillo, et al., 2022), como se discutirá más adelante en este trabajo.

Los posos de café también son ricos en melanoidinas, compuestos de alto peso molecular (~3 y 28 kDa) (Pérez-Burillo, et al., 2022) generados de la reacción de pardeamiento no enzimático (Maillard) entre los azúcares reductores y los compuestos con un grupo amino libre, cuya composición exacta aún no ha sido establecida (Campos-Vega, et al., 2015). Al igual que los polifenoles, estos compuestos también contribuyen con el valor antioxidante que tienen los SCG (Gemechu, 2020).

1.2. Economía circular

Generalidades

Actualmente existe una enorme presión política y social para reducir la contaminación de las actividades industriales. La necesidad de cumplir con las leyes y regulaciones nacionales e internacionales y adoptar estándares de sostenibilidad, han llevado a muchos sectores industriales a adoptar el enfoque de "economía circular", un sistema basado en la autorrenovación. En la práctica, una economía circular implica que el o los

residuos generados pasan, por sí mismos, a convertirse en un nuevo recurso, consecuentemente minimizando la cantidad generada mediante la reutilización, reparación, renovación y reciclaje. Es un ciclo más que una serie de procesos con un principio y un final.

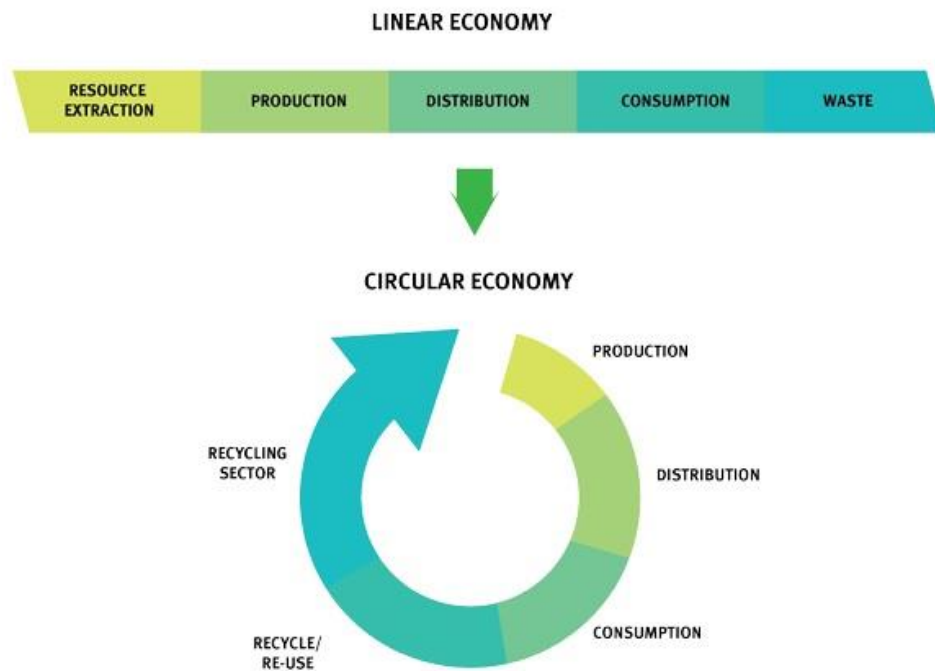


Figura 3. Modelo de economía circular (UNIDO, 2020).

Según el Parlamento Europeo (2018), la adopción de un modelo de economía circular podría beneficiar en la reducción de la presión sobre el cuidado del medio ambiente; mayor seguridad en el suministro de materias primas; y mayor competitividad, innovación, crecimiento y empleo. Por otro lado, también resalta algunos desafíos, como la financiación, los organismos inversores clave, las facilidades de implementación, el comportamiento del consumidor, los modelos comerciales y la gobernanza multinivel.

Con el objetivo de incrementar la eficiencia de los recursos, el mismo Parlamento Europeo en el año 2015 propuso la implementación del modelo de economía circular a

través de un paquete de legislación y plan de acción sobre la gestión de residuos, el cual ha sido monitoreado de cerca en los países miembros.

Residuos agroalimentarios

Se estima que para 2050 la población mundial se acercará a los 9500 millones de habitantes (López, 2020). La población mundial continúa en aumento y a medida que esta aumenta, aumenta la producción de alimentos y consecuentemente la cantidad de residuos generados durante su procesamiento. Se calcula que, entre residuos y subproductos de recolección, se generan más de 500 mil toneladas anuales en el mundo, con el inherente impacto medioambiental y económico para el sector industrial. En España, en el año 2020 se registró una producción de 698.4 toneladas de residuos procedentes solo de la industria de la alimentación, bebidas y tabaco (INE, 2020). Una adecuada valorización aplicada a toda la cadena de suministro de alimentos, desde la producción hasta el consumo, permitiría paliar esta problemática.

La idea de un concepto de biorrefinería ha surgido como un enfoque para abordar los problemas de gestión de los residuos agroalimentarios al convertirlos en compuestos de alto valor añadido debido a su composición (Hijosa-Valsero, et al., 2019). Este modelo integra tecnologías y rutas de transformación a partir de biomasa que, en comparación con una refinería convencional, destacan características como la capacidad de renovación, el almacenamiento energético, la sustitución, la abundancia y la neutralidad de carbono (cero emisiones) (Aristizábal-Marulanda, et al., 2017).

Además, el tamaño industrial del sistema alimentario actual proporciona materia prima a bajo coste y gran escala para la valorización de estos residuos y el desarrollo de subproductos (EcoInnovación, 2021).

La ruta de valor para su aprovechamiento puede estar influenciada por las propiedades fisicoquímicas del residuo así, por ejemplo, aquellos con alto contenido energético son aptos para procesos de producción de energía renovable, mientras que los desechos con una alta concentración de nitrógeno y fósforo son aptos para fertilizantes orgánicos (UNIDO, 2020).

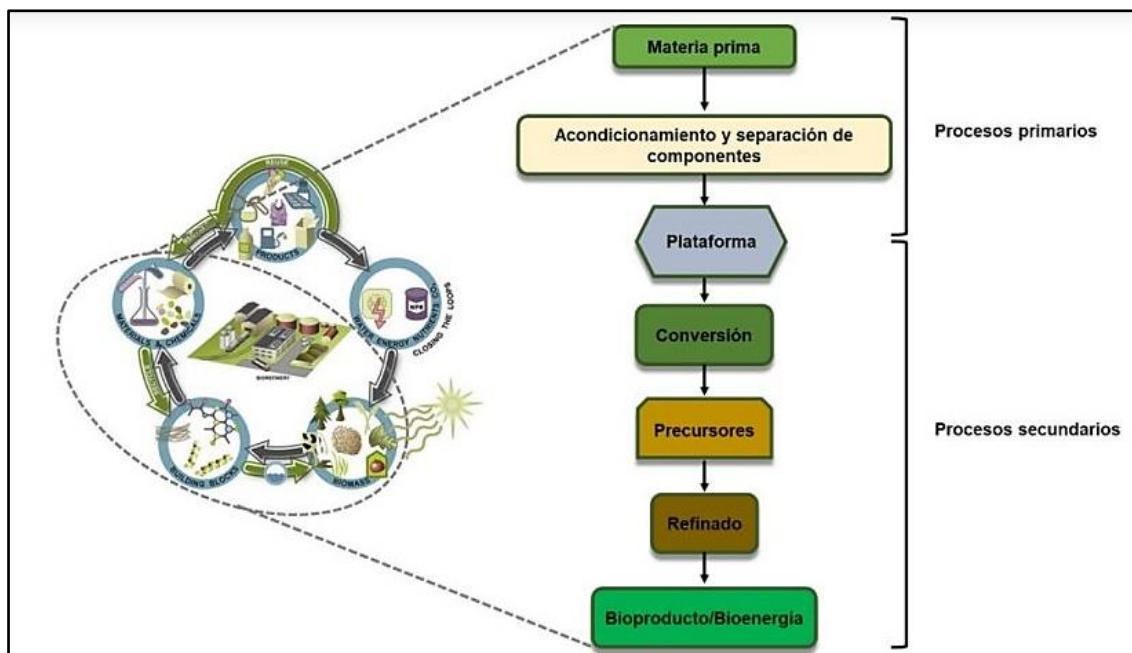


Figura 4. Cadenas de valor integradas y etapas de una biorrefinería (López, 2020).

Revalorización de los posos de café

Basados en los datos de la ICO (2019) sobre el consumo mundial de café que se calcula fue de 9.92 millones de toneladas en el año 2019, Atelge et al. (2021), mediante una regresión lineal ($R^2 = 0.9232$), estiman que para el 2030 esta cifra aumente hasta 12.24 millones de toneladas. El constante aumento del consumo de bebidas de café sugiere una búsqueda cada vez mayor de nuevas estrategias para la gestión y eliminación de los desechos o subproductos derivados de la producción y consumo de este producto, especialmente los SCG, que en su mayoría son depositados en vertederos (McNutt & He, 2019).

Los SCG demandan de una gran cantidad de oxígeno durante el proceso de descomposición, además de la liberación potencial de sustancias tóxicas residuales (cafeína, taninos y fenoles), la liberación de lixiviados y las emisiones de gases de efecto invernadero (Afolabi, et al., 2020). Por esta razón, en la última década se han venido examinando varias oportunidades de revalorización de los SCG también con un enfoque de biorrefinería (Atelge, et al., 2021). Las propiedades funcionales que incluyen: capacidad de retención de agua, capacidad de retención de aceite, actividad y estabilidad

de emulsión y potencial antioxidante (Gemechu, 2020), abren posibilidades para su reutilización en diferentes procesos biotecnológicos que derivan en la extracción y producción de compuestos con importantes aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica (Mussatto, et al., 2011). En la **Tabla 3** se recogen algunas de las aplicaciones encontradas en la bibliografía para los SCG.

Tabla 3. Ejemplos de algunos compuestos bioactivos obtenidos a partir de diferentes tratamientos aplicados a los SCG.

Compuesto bioactivo / producto	Técnica utilizada	Referencia
Azúcares	Hidrólisis ácida	(Mussatto, et al., 2011)
Compuestos fenólicos	Autohidrólisis	(Ballesteros, et al., 2017)
	Extracción sólido-líquido	(Mussatto, et al., 2011)
Lípidos	Sistema Soxhlet	(Vardon, et al., 2013)
Biochar y bio-diesel	Pirólisis lenta	(Vardon, et al., 2013)
Polihidroxialcanoatos (PHA)	Hidrólisis ácida, fermentación con <i>Burkholderia cepacia</i>	(Obruca, et al., 2015)
Ácido láctico	Fermentación líquida con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Kim, et al., 2019)
Compost	Compostaje, vermicompostaje	(Liu & Price, 2011)
Carbón activado	Activación con ZnCl ₂ y pirólisis	(Rufford, et al., 2008)
Etanol	Hidrólisis ácida, fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Burniol Figols, et al., 2016)
Cafeína	Sistema Soxhlet	(Ferreira, et al., 2021)
Hidroximetilfurfurales (HMF)	Fraccionamiento con solventes, fermentación con <i>Metschnikowia</i>	(Prates Pereira, et al., 2019)
Melanoidinas	Infusión, ultrafiltración	(Rufián-Henares & De La Cueva, 2009)

1.3. Carbonización hidrotermal como estrategia de reutilización de los posos de café

Carbonización hidrotermal

La carbonización hidrotermal (HTC, por sus siglas en inglés), aunque fue explorada por primera vez por Friedrich Bergius en 1913, es una tecnología emergente para la transformación y gestión de residuos (Hernández-Soto, et al., 2019).

Este método consiste en la conversión termoquímica llevada a cabo en un recipiente aplicando temperaturas medias (160 - 250 °C) y valores de presión generalmente determinados por las condiciones del proceso (aproximadamente 10 - 50 bar), en medio acuoso, durante unas pocas horas (0.5 - 8 h) (Lucian & Fiori, 2017). De esta manera, sin la adición de ningún otro agente, el agua actúa como reactivo, solvente y catalizador (Cavali, et al., 2023). Esta técnica podría catalogarse como una “hidrólisis física” que, a diferencia de las hidrólisis convencionales que requieren el uso de reactivos (ácidos, bases) o enzimas, no genera residuos químicos contaminantes y es de bajo costo.

La HTC es una alternativa viable para convertir directamente la biomasa con alto contenido de humedad en sólidos ricos en carbono y con alta capacidad calorífica. Estos productos sólidos se denominan “hidrochar” (Law, et al., 2022) y poseen un aspecto similar al lignito o la turba. En este proceso se dan lugar una serie de reacciones de despolimerización donde las largas cadenas de carbono se rompen en cadenas más pequeñas simultáneamente con la remoción del oxígeno en formas de H₂O (deshidratación) y CO₂ (descarboxilación) (Limousny, et al., 2017). Aproximadamente el 75% - 80% de la entrada de carbono se queda en la fase sólida, el 15% - 20% se disuelve en la fase líquida y el 5% restante se convierte en gas, principalmente dióxido de carbono (Shafei, 2023).

Las características del hidrochar resultante, así como el rendimiento del proceso de HTC, están determinadas por los parámetros: temperatura, presión, tiempo de reacción, y el ratio sólido-líquido (Cavali, et al., 2023). La temperatura es el parámetro principal y más influyente ya que gobierna los procesos de degradación de la materia prima. A consecuencia, el resto de los parámetros suelen fijarse en función de la temperatura para

optimizar el proceso de HTC (Hernández-Soto, et al., 2019). En la **Tabla 4**, se muestra un ejemplo del efecto de la variación específica de la temperatura y el tiempo para varias materias primas.

Tabla 4. Efecto de la temperatura y tiempo de residencia de la HTC de varias materias primas sobre el rendimiento y el contenido elemental de los hidrochars (Shafei, 2023).

	Condiciones de HTC	Rendimiento del hidrochar (%)	Composición elemental (%)		
			C	H	O
Bio-residuo	230 °C, 4.5 h	57	54.6	7.5	37.9
			75.2	6.4	11.1
Residuo alimentario	250 °C, 20 h	46	45.7	6.2	43.9
			75.2	6.4	11.1
Lodos residuales	230 °C, 6 h	51	51.8	6.8	37.9
			72.6	7.2	15.6
Madera	230 °C, 5 min	75	50.3	6.0	43.3
			56.1	5.9	37.9

Por otro lado, la fase líquida resultante de la HTC, denominada “licor” se compone en gran medida de componentes orgánicos solubles, que son fácilmente degradables, además contiene nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio. La composición, sin embargo, varía en función de la materia prima de partida (Cavali, et al., 2023). Este residuo también tiene un alto potencial para su revalorización como sustrato de fermentación (Ruan, et al., 2015).

Ventajas de la HTC sobre otros procesos de transformación térmica

En comparación con otros procesos comunes de transformación térmica como la pirólisis, gasificación, torrefacción e incineración, la principal ventaja que ofrece la carbonización hidrotermal es la posibilidad de usar un amplio rango de residuos húmedos sin la necesidad de aplicar un proceso de secado previo. Los residuos agroalimentarios (Kim, et al., 2017), forestales (Sun, et al., 2020), lodos de depuración (Jellali, et al., 2022), microalgas (Law, et al., 2022) entre otros, son un buen sustrato para la conversión en productos de alto valor mediante esta técnica.

Según Shafei (2023), otras ventajas que destacan el empleo de esta técnica sobre las antes mencionadas son:

- Alta eficiencia de conversión a temperatura operativa relativamente baja y bajo presión autógena.
- Al ser un proceso exotérmico, el consumo de energía requerido para mantener la temperatura del reactor durante el proceso de carbonización es significativamente menor.
- Producción de materiales nanotecnológicos modernos a partir de recursos renovables homogéneos como los azúcares o la celulosa. Estos materiales avanzados tienen potencial para futuras aplicaciones como electrodos para baterías recargables, celdas de combustible o supercondensadores, almacenamiento de gas, sensores o suministro de fármacos.
- Aprovechamiento de ambos residuos generados: hidrochar y licor, con la posibilidad de trabajar con un concepto de biorrefinería.

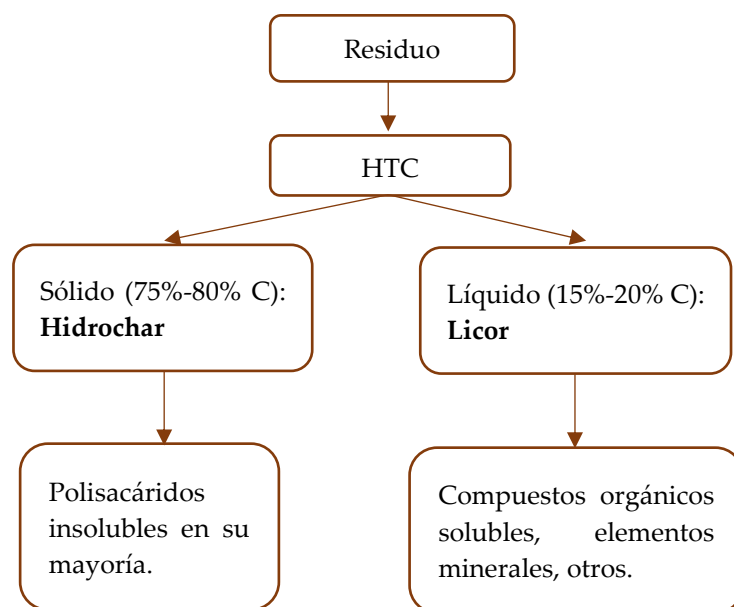


Figura 5. Esquema de generación de productos de la carbonización hidrotermal de un residuo lignocelulósico.

Uso de hidrochars en el suelo

Aproximadamente el 81% del carbono orgánico (OC) que participa activamente en el ciclo global del carbono se almacena en los suelos. Este reservorio desempeña un papel esencial en la funcionalidad del ecosistema y la sustentabilidad agrícola (Sun, et al., 2020).

En este sentido, con el fin de restaurar y devolver el carbono al suelo, los materiales carbonosos derivados de la conversión termoquímica de biomasa lignocelulósica se han venido estudiando como una enmienda de suelos rentable y respetuosa con el medio ambiente (Libra, et al., 2011; Baronti, et al., 2017). Estos bio-productos tienen el potencial de secuestrar carbono en el suelo a corto plazo, mejorar la capacidad de retención de agua, aumentar la retención de nutrientes, disminuir la densidad aparente y retener compuestos tóxicos provenientes de pesticidas o metales pesados (Cavali, et al., 2023). La reducción de emisiones de gases de efecto invernadero como CO₂, CH₄ y N₂O es otro aspecto importante que cabe recalcar si se comparan con otras técnicas de transformación utilizadas como el compostaje o la combustión (Shafei, 2023).

Según Cavali et al. (2023), las características fisicoquímicas variables del hidrochar, como pH, contenido de cenizas, porosidad y aromaticidad determinan su comportamiento en el suelo. De igual manera, los diferentes tipos de suelo presentan distintas interacciones con el hidrochar dando lugar a diversas respuestas sobre la fertilidad y por ende, sobre el crecimiento de las plantas.

Como parte del uso de los hidrochars en este campo, Hernández-Soto et al. (2019), propusieron también el uso de hidrochars procedente de diferentes restos orgánicos domésticos como sustituto de la turba, comprobando su viabilidad mediante una prueba de germinación (Zucconi et al., 1981).

Sin embargo, a pesar de los amplios beneficios que puede ofrecer la aplicación de los hidrochars en el suelo, existe un limitante. Algunos estudios han reportado contenidos de sustancias potencialmente dañinas como furanos, furfurales, fenoles y algunos metales que podrían comprometer su aplicación en el suelo (Sun, et al., 2020). Bargmann et al. (2013), por ejemplo, encontró una inhibición significativa de la germinación de la

cebada relacionada estrechamente con los compuestos de carbono orgánico disueltos y absorbidos en hidrochars de diferentes materias primas durante su procesamiento.

Principales aplicaciones de los hidrochars de posos de café

Debido a la rica composición en materia orgánica (celulosa, hemicelulosa y lignina) de los SCG, sus hidrochars han sido más atractivos para fines de recuperación de energía. Afolabi et al, (2020) y Kim et al, (2017), utilizaron los SCG como sustrato para la carbonización hidrotermal y reportaron productos con mayor contenido de carbono y carbono fijado debido a que entre el 60% y el 84% del carbono del residuo se queda retenido en el hidrochar (Libra, et al., 2011).

En un primer trabajo realizado por Kim et al. (2017), los autores encontraron que la mayor eficiencia de recuperación de energía del hidrochar se da a temperaturas de reacción óptimas entre 210 y 240 °C, alcanzando un poder calorífico de aproximadamente 26–27 MJ/kg. Más adelante Afolabi et al. (2020), evaluó las propiedades combustibles y el comportamiento de combustión de estos hidrochars y obtuvo una mayor capacidad calorífica de 33.5 MJ/kg con un rendimiento entre 15.8 y 44.7% bajo condiciones de HTC más exactas: 216 °C y 1 h.

En el campo agrícola, Cervera-Mata et al. (2020) estudiaron el efecto de diferentes transformaciones de SCG (vermicompost, compost, pirólisis, etc.) sobre su viabilidad como enmienda orgánica del suelo. En ese trabajo, se incluyó en una fase piloto una muestra de hidrochar de SCG, denominado en el artículo "SCG hidrolizado". Los autores descubrieron que este bio-producto era tóxico para el crecimiento de las plantas; sin embargo, tenían una aparente capacidad de movilización de elementos nutrientes. En otro trabajo (Cervera-Mata, et al., 2022), el mismo grupo de investigación estudió el efecto de diferentes subproductos de los SCG, entre ellos: biochars (pirólisis a 270 y 400 °C), vermicompost e hidrochars (160 y 200 °C) en la dinámica del C y N en el suelo. Se encontró que tanto los SCG como sus hidrochars, por su alto contenido en moléculas transformables, son fácilmente descompuestas por los microorganismos, liberando CO₂ a la atmósfera. Sin embargo, dejan una gran cantidad de C remanente en el suelo (87%)

aunque el porcentaje es mucho mayor en el caso del biochar (99%). No existen más estudios en la literatura respecto al uso de estos bio-productos en el suelo.

Por otro lado, el líquido obtenido del proceso de HTC, denominado de aquí en adelante como “licor”, también se ha empleado para obtener manooligosacáridos (MOS) a partir de SCG como promotor de una comunidad microbiana intestinal más saludable. Las mejores condiciones de HTC reportadas para dicho objetivo se obtuvieron a 185 °C durante 1 h (Pérez-Burillo, et al., 2019).

1.4. Hambre oculta y biofortificación

Hambre oculta

La deficiencia de micronutrientes en la dieta, como zinc, yodo, vitamina A, hierro, es una forma de desnutrición conocida como "hambre oculta". Afecta a más de 2000 millones de personas en todo el mundo y se produce cuando la ingesta o la absorción de vitaminas y minerales esenciales no es suficiente, lo que provoca graves problemas de salud en el mundo en desarrollo (Global Hunger Index, 2014).

Para efectos de enfoque en el trabajo realizado en esta tesis doctoral, nos centraremos en la problemática del zinc y el hierro. La deficiencia de zinc está relacionada, por ejemplo, con el retraso del crecimiento físico, el deterioro del sistema inmunitario y la salud reproductiva, etc. (Levenson & Morris, 2011), mientras que la deficiencia de hierro se identificó en 2013 como la causa predominante de anemia en el 27% de la población mundial, lo que hace que la anemia por deficiencia de hierro sea un problema de salud importante (Ning & Zeller, 2019). Según Adriano (2001), el Zn disponible o extraíble en los suelos representa una fracción muy pequeña del contenido total de zinc (aproximadamente 0.81-4.5 ppm de 55.2 ppm); el caso del Fe difiere ya que, si bien este elemento está presente en grandes cantidades, su disponibilidad está comprometida debido a la baja solubilidad de los óxidos de Fe (Colombo, et al., 2014).

Se han utilizado varias estrategias para abordar las deficiencias de micronutrientes: diversificación de la dieta, suplementos farmacéuticos, fortificación de alimentos comerciales y biofortificación a nivel genético y agronómico.

Biofortificación agronómica

Se denomina biofortificación agronómica al uso de fertilizantes a través de la aplicación directa al suelo, alimentación foliar, o tratamiento de semillas para enriquecer con micronutrientes la parte comestible de las plantas (Dhaliwal, et al., 2022). Además, muchos informes evidencian que la biofortificación también tiene una influencia significativa en la síntesis de otros compuestos que exhiben propiedades nutricionales (Szerement, et al., 2022).

Tabla 5. Ventajas y limitaciones de los diferentes métodos para la biofortificación agronómica (Praharaj, et al., 2021).

Método de aplicación	Ventajas	Limitaciones
Suelo	• Minimiza la deficiencia en el suelo. • El efecto residual puede beneficiar futuros cultivos.	• Altos requerimientos de fertilizante. • La disponibilidad del nutriente puede disminuir debido a las propiedades del suelo.
Foliar	• Menor requerimiento de fertilizante. • No se ve afectado por las propiedades del suelo.	• No se cumple el requisito de cultivo en la etapa inicial de plántula. • No se pueden aplicar dosis muy altas del micronutriente.
Semillas	• Menor requerimiento de fertilizante. • Adecuado para ambientes de estrés.	• No se puede aplicar una mayor cantidad de nutrientes con este método ya que una alta concentración puede afectar negativamente la germinación.

La biofortificación agronómica es la estrategia más prometedora hasta el momento debido a su relativa fácil aplicación, bajo costo, efectividad y casi ningún efecto adverso en el rendimiento de los cultivos pudiendo alcanzar a sectores poblacionales vulnerables, especialmente los más pobres (Koç & Karayiğit, 2022). Por esa razón, los cultivos básicos y extensivos como el trigo han sido considerados una estrategia útil para el estudio de la biofortificación (Praharaj, et al., 2021).

También se han practicado numerosos enfoques indirectos de gestión, como la selección de cultivos y diseño de sistemas de cultivo adecuados, la aplicación de cal, azufre elemental y otras enmiendas orgánicas para mejorar las condiciones del suelo que mejoran la biodisponibilidad de micronutrientes para facilitar la absorción de las plantas (Dhaliwal, et al., 2022).

Según Lowe (2021), los factores clave para el escalado exitoso de un programa de biofortificación son:

- Evidencia robusta de mejoramiento en el estado nutricional de la población blanco.
- Evidencia de aceptabilidad del cultivo biofortificado tanto por parte de los productores como de los consumidores.
- Compromiso y promoción del cultivo con los involucrados en la toma de decisiones y consumidores.

Biofortificación agronómica de zinc y hierro

Debido los altos contenidos de carbonatos y el elevado pH de algunos suelos, la presencia y/o biodisponibilidad de estos micronutrientes se ve afectada, especialmente la del hierro. Los quelatos comerciales (DTPA, EDTA, EDDHA...) y las sales son las herramientas más utilizadas para lograr la biofortificación agronómica de Zn y Fe (Kozik, et al., 2011; Mohammadi & Khoshgoftarmanesh, 2014), sin embargo, presentan algunas limitaciones. El primero podría tener efectos negativos en las plantas, como toxicidad, alteración del equilibrio de nutrientes, entre otros efectos secundarios (Mohammadi & Khoshgoftarmanesh, 2014), y el segundo en formas muy solubles tiende

a bloquearse en el suelo por diferentes mecanismos (Gregory, et al., 2017). Por estos motivos, la aplicación foliar ha sido el modo de biofortificación agronómica más estudiada en los últimos años (Zulficar, et al., 2020; Pal, et al., 2021; Preciado-Rangel, et al., 2022).

Para el caso del zinc, la aplicación foliar sigue siendo la técnica más ensayada debido a los aumentos significativos demostrados en las concentraciones de este micronutriente en el grano (Zou, et al., 2012). Los cultivos que han respondido mejor a estas técnicas son el arroz, el trigo y el maíz, siendo el trigo el que mejores resultados ha mostrado hasta el momento (Praharaj, et al., 2021). Poca información existe en la literatura respecto a la aplicación de Zn desde el suelo.

Por otro lado, la biofortificación en Fe desde el suelo está más estudiada a pesar de los inconvenientes dados por las características del suelo ya mencionadas. El uso de microorganismos productores de sideróforos (Patel, et al., 2018) es una de las nuevas alternativas exploradas para movilizar el hierro no disponible y/o aportar más cantidad asimilable.

Posos de café como agentes de biofortificación

Dentro de los esfuerzos que se han venido haciendo para combatir el hambre oculta y encontrar nuevas alternativas para reutilizar los residuos agroindustriales, el grupo de investigación de Cervera-Mata (2021a) estudió el empleo de los SCG y melanoidinas extraídas del mismo residuo, funcionalizados con Zn y con Fe para incrementar el contenido de estos micronutrientes en lechugas.

Los investigadores, en estudios previos, encontraron que los posos de café pueden aumentar el nivel de elementos minerales importantes para la nutrición humana (Cervera Mata, et al., 2019), lo que se atribuye a la presencia de algunos compuestos quelantes como los polifenoles (Morikawa & Saigusa, 2008) y las melanoidinas (Rufián-Henares & De La Cueva, 2009). Los resultados de la aplicación de estos bio-productos funcionalizados a los que llamaron “bio-quelatos” mostraron un aumento del contenido

de Fe entre un 28 y un 30%, mientras que el Zn mostró un incremento aún mayor, hasta un 177 a un 416 %.

Este es el único estudio reportado en la literatura respecto al uso de los SCG para la biofortificación agronómica y en esta tesis doctoral hemos tomado también esta aplicación como referencia para hipotetizar que los hidrochars derivados de SCG conservan o exhiben un aumento de este potencial ya que varios autores sugieren su uso como enmienda del suelo para mejorar la capacidad de retención de nutrientes del suelo aumentando el suministro de nutrientes para las plantas y disminuyendo las pérdidas debidas a la lixiviación (Lucian & Fiori, 2017), inconveniente que presentan los quelatos comerciales.

2. OBJETIVOS

Por todo el conocimiento previo expuesto, se puede afirmar que los posos de café son un producto con una clara vocación para la economía circular ya que contienen muchos compuestos que son susceptibles de extracción para su revalorización. Por tanto, el objetivo principal de la presente tesis doctoral es **estudiar nuevas alternativas de revalorización de este residuo partiendo de la obtención de subproductos de segunda generación mediante carbonización hidrotermal (HTC)**, proceso que está poco estudiado con este residuo.

Se analizarán también en profundidad las características de los subproductos obtenidos y sus posibles aplicaciones, que en el caso de la fracción sólida (hidrochar) serán las agronómicas. Se avanzará también en el estudio de la fracción líquida (licor) para entender mejor sus aplicaciones futuras.

Para el cumplimiento de este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Transformar mediante carbonización hidrotermal los posos de café en un reactor en discontinuo aplicando diferentes condiciones de temperatura y presión. Evaluar la influencia de dichos parámetros sobre las características morfológicas, físicas, químicas y fisicoquímicas del hidrochar.
2. Caracterizar desde el punto de vista físico, químico y fisicoquímico el hidrochar de SCG obtenido a tres diferentes temperaturas medias-bajas con vistas a su aplicación en el suelo.
3. Estudiar la composición general de los licores de HTC obtenidos a las mismas condiciones de temperatura del apartado anterior. Analizar las variaciones respecto a la composición proximal, contenido de azúcares y de compuestos potencialmente tóxicos que puedan condicionar su revalorización.
4. Evaluar el efecto que tienen la aplicación de dos tratamientos previos a la carbonización hidrotermal, el lavado con etanol y el desgrasado, sobre los hidrochars respecto a: 1) la variación del contenido de compuestos tóxicos y, 2) la mejora de la estructura de las partículas.
5. Funcionalizar con sales inorgánicas de Zn y Fe los hidrochars de SCG para la obtención de bio-quelatos agrícolas.

6. Aplicar un proceso de activación química a los hidrochars previo a su funcionalización mineral para mejorar su aplicación como bio-quelatos agrícolas. Evaluar además los cambios morfológicos, físicos, químicos y fisicoquímicos sobre los bio-productos después de aplicado el proceso.
7. Evaluar el impacto de los hidrochars de SCG aplicados como enmienda orgánica de suelos en dos dosis controladas. Analizar los efectos sobre la fertilidad del suelo y sobre el desarrollo de la planta.
8. Evaluar el uso de los hidrochars de SCG funcionalizados con Zn y Fe como bio-quelatos agrícolas para la biofortificación *in vitro* de lechuga. Comparar su efecto con los mismos bio-productos sin funcionalizar y seleccionar el modo de aplicación más adecuado en función de: 1) la concentración de micronutriente ó 2) la cantidad de bio-producto.
9. Evaluar el efecto de biofortificación de lechuga de los hidrochars activados y funcionalizados con Zn y Fe utilizando una dosis subtóxica. Analizar además la influencia en la movilización de otros elementos minerales y el impacto sobre los aspectos nutricionales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Posos de café

Los residuos procedentes de la preparación de bebidas de café fueron proporcionados por la cafetería de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. El residuo se depositaba en contenedores separados y se entregaba al Departamento de Edafología y Química Agrícola según la demanda.

Los posos de café se extendieron sobre papel de filtro en una superficie plana, se secaron a temperatura ambiente (18-20 °C) durante 15 días aproximadamente para retirar la humedad residual y se almacenaron en un contenedor plástico en un lugar fresco.

3.1.2. Suelos

Para los ensayos de cultivo se han empleado dos suelos agrícolas mediterráneos recolectados en la provincia de Granada. El primer suelo, denominado “Suelo 1” de ahora en adelante, fue tomado de una parcela experimental del Centro IFAPA “Camino de Purchil” (37°11'15"N, 3°36'39"O) situado en el término municipal de la ciudad de Granada. El segundo suelo, denominado “Suelo 2” de ahora en adelante, se recolectó en las inmediaciones del pueblo de Pinos Puente (37°14'7.1"N, 3°45'40.7"W).

El muestreo de ambos suelos se realizó de la capa arable, que es aquella comprendida entre los primeros 20 cm de profundidad. Después de la recolección, se extendieron sobre una superficie plana y se dejaron secar a temperatura ambiente (18-20 °C). Se tamizaron a 5 mm y se almacenaron en un lugar fresco. La **Tabla 6** muestra las principales características de estos suelos.

El Suelo 1 fue clasificado como Fluvisol calcárico, mientras que el Suelo 2 fue clasificado como Calcisol cámbico (IUSS Working Group WRB, 2014). Ambos suelos son de tonos pardo-grisáceo. Según el USDA, la clase textural del Suelo 1 indica que es de tipo franco a franco-limoso, con una ligera menor capacidad de retención de agua que el Suelo 2, que es de tipo arcilloso. Esta diferencia se ve reflejada también en la capacidad de campo (W_{33}) y punto de marchitez permanente (W_{1500}). Sin embargo, ambos suelos tienen un pH

alcalino y la misma relación C/N. Otras características importantes para destacar son: la cantidad de fósforo (P) y potasio (K) asimilables, así como de nitrógeno (N) y carbono orgánico (CO), que son mayores en el Suelo 2 que en el Suelo 1. Es un suelo aparentemente más rico en nutrientes y sales (CE₂₅), pero los elevados niveles de carbonato cálcico equivalente (CaCO₃ eq.) le confieren una capacidad amortiguadora del pH que podría mejorar tanto la adsorción como la precipitación de elementos minerales en el suelo, pudiendo comprometer la biodisponibilidad de estos nutrientes para las plantas (Adriano, 2001).

Tabla 6. Propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de los suelos 1 y 2 utilizados.

	Suelo 1	Suelo 2
Color (Munsell)	2.5Y 4/2 pardo grisáceo oscuro	10YR 3.5/2 pardo grisáceo oscuro
Granulometría (%)		
Arena	37.5	28.1
Limo	50.0	13.9
Arcilla	12.5	58.0
pH	8.7	8.2
CE ₂₅ (dS/m)	0.35	1.30
CO (%)	0.91	1.36
N (%)	0.03	0.11
C/N	13	13
CaCO ₃ eq. (%)	13.78	39.00
K asimilable (mg/kg)	205.15	453
P asimilable (mg/kg)	11.02	69
W ₃₃ (%)	20.7	26.4
W ₁₅₀₀ (%)	6.1	15.6

CE₂₅, conductividad eléctrica medida a 25 °C; CO, carbono orgánico; N, nitrógeno total; C/N, relación carbono-nitrógeno; CaCO₃ eq., carbonato cálcico equivalente; W₃₃ y W₁₅₀₀, retención de agua a -33 y -1500 kPa, respectivamente.

3.1.3. Planta para ensayo

Los ensayos de cultivo *in vitro* se llevaron a cabo con lechugas de la variedad “Little Duende” (*Lactuca sativa* var. *longifolia*) debido a su pequeño tamaño y fácil manejo en condiciones de laboratorio. Las plantas de 30 días de edad fueron provistas por el invernadero comercial Saliplant S.L. ubicado en la provincia de Granada. Estas lechugas tienen un peso fresco (PF) promedio de 1.52 ± 0.21 g y un peso seco (PS) promedio de 0.12 ± 0.04 g.



Figura 6. *Lactuca sativa* var. *longifolia* de 30 días de edad utilizada en los ensayos.

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Carbonización Hidrotermal (HTC)

El procedimiento se llevó a cabo en discontinuo, utilizando un reactor Highpreactor™ (BR-300, Berghof Ltd, Alemania) de 1 L de capacidad. El aparato consta de un cuerpo de reactor, un calentador y un condensador de vapor que opera bajo gas N₂ (12 MPa) (Figura 7). Además, se acopló el sistema de agitación Heidolph RZR-2000 y se introdujo una sonda de temperatura conectada a un termómetro digital Voltcraft® K201 300K (Figura 8). Para los experimentos, se mezclaron 30 g de SCG con agua destilada en relación 1:10 (p:v) (Passos & Coimbra, 2013). Luego, se ajustaron los parámetros del proceso (temperatura, presión) de acuerdo con las condiciones a ensayar. Cada tanda

tuvo una duración de 1 h (rampa de calentamiento de 12 a 15 min) y una velocidad de agitación de 300 rpm. Después de la HTC, se dejó enfriar el reactor hasta alcanzar la presión atmosférica y temperatura ambiente. Los subproductos sólidos resultantes (hidrochars) se recuperaron por filtración al vacío. Se secaron en un horno a 60 °C durante 24 horas y se almacenaron en recipientes plásticos en un ambiente fresco. El residuo líquido recogido en el Kitasato después de la filtración se almacenó en frascos de color ámbar protegidos de la luz y se almacenaron a 4 °C.

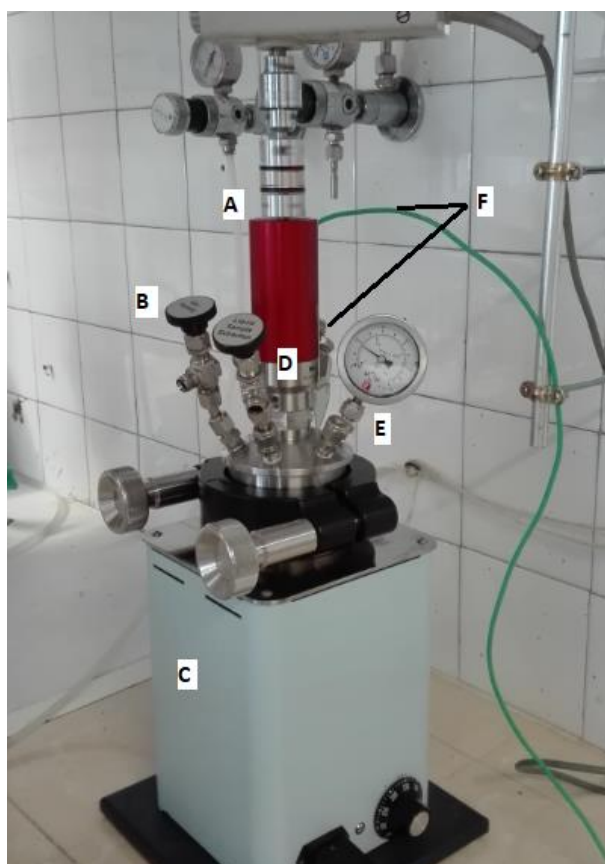


Figura 7. Reactor en discontinuo Highpreactor™ (BR-300, Berghof Ltd, Alemania) con (A) agitador, (B) válvula para salida/entrada de gas, (C) camisa de calor, (D) sistema acoplado para toma de muestras, (E) manómetro y (F) orificio para sensor de temperatura.



Figura 8. A) Termómetro utilizado para el control de la temperatura en el reactor, y B) Sistema de agitación acoplado.

3.2.2. Métodos de caracterización de los posos de café y sus hidrochars

Morfología

Se analizaron las muestras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, los bio-productos se fijaron en un porta-muestras estándar con cinta adhesiva de carbono de doble cara y se metalizaron con grafito. Estas placas se visualizaron en un microscopio electrónico de barrido de alta resolución y presión variable (VPSEM-FESEM) SUPRA40VP (ZEISS, Oberkochen, Alemania) ubicado en las instalaciones del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

Distribución del tamaño de partícula

Se realizó una granulometría automatizada por el método de difracción de luz láser en medio líquido en un Mastersizer 2000LF (Malvern Panalytical Ltd). Se analizó la distribución del tamaño de partícula en agua, en un rango de tamaño comprendido entre 0.02 y 1500 micras, considerando un índice de refracción de la muestra de 1.530 e índice de refracción del líquido de 1.330. Se recogieron los datos de: diámetros del 10%, 50% y 90% de finos (D10, D50, D90), el rango mínimo y máximo del tamaño de partículas,

gráficas de su distribución y finalmente se calculó el coeficiente de uniformidad (Cu) de cada bio-producto con la siguiente fórmula:

$$Cu = \frac{D_{60}}{D_{10}} \quad (1)$$

Donde:

D60, es el diámetro para el cual el 60% de las partículas son más finas.

D10, es el diámetro para el cual el 10% de las partículas son más finas.

Superficie Específica

Para el análisis del área superficial específica se empleó el modelo de Brunauer-Emmet-Teller (BET). Previo a este procedimiento, los bio-productos se secaron a 120 °C durante 24 h en una estufa para retirar restos de humedad. Seguido, se sometieron a una evacuación en vacío para su desgasificación a 120 °C durante 11 h. Una vez realizado este pretratamiento, las muestras fueron analizadas mediante isothermas de adsorción de N₂ a 77 °K (-196.15 °C). El procedimiento se llevó a cabo en un analizador de área superficial y porosidad MicroActive 5.02 ASAP 2420 en las instalaciones de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga (UMA).

pH

Se analizó en una proporción 1:10 (p:v) de bio-producto y agua destilada. La mezcla formada se agitó durante 1 h y se realizó la medida con un pH-metro calibrado GLP 21 marca Crison®.

Conductividad eléctrica

Con un conductímetro GLP 31 marca Crison® a 25 °C se analizó el extracto líquido obtenido por filtración de la proporción 1:10 (p:v) del bio-producto y agua destilada del apartado anterior.

Análisis Proximal

Para la caracterización de los bio-productos como un material carbonoso, se aplicó el método ASTM D1762-84 para el análisis de materia volátil (a 950 °C), contenido de

cenizas (a 750 °C), contenido de humedad (a 105 °C) y finalmente el contenido de carbono fijado aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Carbono fijado (\%)} = \frac{\text{peso a } 105^{\circ}\text{C} - \text{peso a } 950^{\circ}\text{C} - \text{peso a } 750^{\circ}\text{C}}{\text{peso a } 105^{\circ}\text{C}} \times 100 \quad (2)$$

Análisis Elemental

El análisis del contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno se realizó utilizando un analizador elemental THERMO SCIENTIFIC Modelo Flash 2000 en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. El contenido de oxígeno se calculó por diferencia.

Carbono orgánico

El carbono orgánico (CO) se determinó por digestión húmeda con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y H_2SO_4 a 155 °C durante 5 min –desde la ebullición– y posterior determinación por titulación con sal de Mohr 0.1 N de acuerdo con el método de Tyurin (1951).

Polifenoles totales

Para la determinación del contenido de polifenoles totales (PT) se empleó el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente por g de bio-producto (mg GAE/g). Las muestras sólidas se sometieron a un proceso de extracción previo con metanol 70%.

Potasio asimilable

Para analizar la cantidad de potasio asimilable, se tomó en cuenta el K intercambiable y el K soluble en agua. Se realizó una extracción con una solución neutra de AcONH_4 1 N y se determinó la concentración de dicho extracto con un fotómetro de llama PFP7 (JENWAY®, Staffordshire, UK).

Fósforo asimilable

Se midió la cantidad de fósforo asimilable para las plantas empleando el método de Olsen-Watanabe. La medición del color se realizó a 825 nm en un espectrofotómetro tipo Helios Alpha (Thermo Scientific Inc. Waltham, MA, USA).

Contenido mineral

Primero se llevó a cabo una mineralización de cada muestra con HNO₃ (65%) y H₂O₂ a 180 °C en un digestor de microondas Multiwave 5000 (Anton Paar). El contenido mineral de los extractos obtenidos se determinó mediante dos métodos:

- Espectrometría de absorción atómica (AAS) (Varian SpectraA, 140. Mulgrave Victoria, Australia).
- Espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente PerkinElmer® Avio500 (ICP-OES; Waltham, MA, USA).

Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

Se realizó una espectroscopía de resonancia magnética nuclear con rotación de ángulo mágico de polarización cruzada de ¹³C (13C-CPMAS-NMR) en las instalaciones de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Jaén. El análisis se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker BioSpin GmbH 500 MHz (Rheinstetten, Alemania), con rotores de circonio de 4 mm a una velocidad de giro de 10 kHz. Los parámetros empleados fueron:

- tiempo de contacto: 1 ms
- tiempo entre scans: 3 s
- tiempo de adquisición: 20 ms
- número de scans: 1300

La clasificación de grupos funcionales del carbono orgánico se realizó de acuerdo con lo descrito por Fernández-Bayo et al. (2018), de la siguiente manera: (i) C alifático unido a otra cadena alifática corta (0–27 ppm); (ii) C alifático unido a otra cadena alifática larga (27–47 ppm); (iii) C alquilo-N y O (47–113 ppm); (iv) C- fenol aromático o C-éter fenílico (113–160 ppm), y (v) C-carboxilo C-keto (160–210 ppm).

Se realizó también una caracterización estructural mediante el cálculo de la hidrofobicidad (HB/HI), ratio alquilo (A/AO), aromaticidad (ARM) y el ratio de lignina (LR) obtenidos a partir de los dominios de carbono orgánico utilizando las ecuaciones descritas por Fregolente et al. (2021):

$$HB/HI = \frac{\%(113-160) + \%(0-27) + \%(27-47)}{\%(27-47) + \%(47-113) + \%(160-210)} \quad (3)$$

$$A/AO = \frac{\%(0-27) + \%(27-47)}{\%(47-113)} \quad (4)$$

$$ARM (\%) = \frac{\%(113-160)}{\%(0-27) + \%(27-47) + \%(47-113)} \times 100 \quad (5)$$

$$LR = \frac{\%(0-27) + \%(27-47)}{\%(47-113)} \quad (6)$$

Materia grasa

Se determinó por gravimetría, previa hidrólisis con HCl 3 N. La extracción de la grasa se realizó con éter de petróleo mediante el sistema Soxhlet. Los resultados se expresaron como porcentaje de materia grasa (%MG). Esta determinación se realizó en la Unidad de Análisis de Alimentos (AAL) del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

Perfil lipídico

La determinación del perfil de ácidos grasos se realizó por esterificación y metilación siguiendo el método de Lepage y Roy (1986). Se analizaron 11 ácidos grasos mediante cromatografía de gases: mirístico (C14), palmítico (C16), esteárico (C18), oleico (Z C18:1n9), linoleico (Z C18:2n6), linolénico (C18:3n3), araquidónico (C20), cis 11-eicosenoico (C20:1), behénico (C22), lignocérico (C24) y C18:1n7 (W7).

Los valores de cada ácido graso se expresaron en porcentaje relativo respecto al total de ácidos grasos (AG) identificados en las muestras. Se calculó también el porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM), y poliinsaturados (AGP) mediante suma.

3.2.3. Métodos de análisis de los licores de HTC de los posos de café

Para el análisis de polifenoles totales se utilizó la misma técnica descrita en el apartado 3.3 sobre “Métodos de caracterización de los posos de café y sus hidrochars”. El resto de la metodología empleada se detalla a continuación.

Composición Proximal

Se analizó el contenido de humedad por desecación en estufa a 102 °C, cenizas por incineración en horno mufla a 550 °C, proteínas por el método Kjeldahl previa digestión ácida utilizando como factor de conversión 6.25, grasa por el método Soxhlet previa hidrólisis ácida e hidratos de carbono por diferencia en una base de 100 ml. Esta determinación se realizó en la Unidad de Análisis de Alimentos (AAL) del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

Azúcares totales

Los azúcares totales (AT) de las muestras se expresaron en función del contenido en azúcares reductores. La determinación se realizó mediante el método DNS de Miller (1959).

Furfurales e hidroximetilfurfurales (HMF)

Las muestras filtradas (0.22 µm) se analizaron en un sistema de HPLC (Accela 600, Thermo Scientific, USA) equipado con un detector UV-vis de longitud de onda variable (PDA) ajustado a 284 nm. Se utilizó una columna C18 Tracer Extrasil ODS2 5 µm 250 x 0.4 de Teknokroma termostatizada a 32 °C. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo al 5% en agua (v:v) con un caudal de 1 ml/min en condiciones isocráticas durante 15 min. Los furfurales y HMF se cuantificaron mediante el tiempo de retención y las curvas de calibración dentro del rango de 0.01 a 10 mg/L y de 0.01 a 5 mg/L, respectivamente. Los resultados finalmente se expresaron como g/L de residuo.

Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Las muestras filtradas (0.22 µm) se analizaron en un sistema de HPLC (Accela 600, Thermo Scientific, USA) equipado con un detector UV-vis de longitud de onda variable (PDA) ajustado a 210 nm. Como fase móvil se utilizó tampón fosfato 0.1 M (pH 2.8) con

acetonitrilo en una proporción 99:1 (v:v) con un caudal de 1.25 ml/min. La columna utilizada fue una fase reversa Aquasil C18 (Thermo Scientific, USA) (150 x 4.6 mm, 5 µm), con un tiempo de ejecución total de 30 min. Los estándares de ácido acético, propiónico, n-butírico, isovalérico y pentanoico (Sigma-Aldrich, Alemania), se prepararon en un intervalo de concentración de 10-0.01 mM. Los resultados finalmente se expresaron en g/L de residuo.

3.2.4. Métodos de transformación aplicados a los hidrochars

Lavado

Se prepara una suspensión de 30 g de SCG en 750 ml de etanol al 60%. Se lleva a baño maría a 60 °C con una agitación de 150 rpm por 30 min. Se realiza una filtración en vacío para la recuperación del residuo sólido y este se seca en estufa a 60 °C por 24 horas.

Desgrasado

La extracción de la materia grasa de los bio-productos se realizó mediante el sistema Soxhlet con n-hexano como disolvente orgánico a 80 °C por 3 h.

Funcionalización

Los bio-productos se funcionalizaron con Fe o Zn para la obtención de bio-quelatos siguiendo un procedimiento modificado descrito por Morikawa & Saigusa (2008). Las sales empleadas fueron: Sulfato de hierro (II) heptahidratado $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PM 278.01) y Sulfato de zinc heptahidratado $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PM 287.56), para bio-quelatos de Fe y Zn, respectivamente (Sigma, St. Louis, MO). En cada caso se utilizaron 40 g de bio-producto, 10 g de sal y 400 ml de agua destilada. Las suspensiones se agitaron a 120 rpm por 24 h en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Se centrifugaron (2500 rpm, 10 min, 20 °C) y se decantaron. El residuo sólido resultante se lavó 3 veces con agua destilada utilizando el mismo método de centrifugación. Los productos funcionalizados se secaron en estufa a 50 °C durante 24 h, se pesaron y se almacenaron.

Activación

El método de activación de los SCG y sus hidrochars se desarrolló por completo en la presente tesis doctoral. Para ello, se realizó una revisión bibliográfica de procesos similares aplicados a otros materiales y a los propios SCG (Simoes, et al., 2009; Hu, et al., 2012; Cortes Ortiz, et al., 2014; Lee, 2021; Chan, et al., 2022; Massaya, et al., 2022).

El procedimiento consistió en una suspensión de 40 g de bio-producto en 400 ml de NaOH 0.1 M. Esta suspensión se calentó hasta 40 °C a 450 rpm durante 1 h en una placa calefactora. Al término de dicho tiempo, se dejó enfriar y el pH se ajustó a 7 con HCl 1 N, se centrifugó a 3000 g y se decantó. Los residuos sólidos se secaron en estufa a 60 °C durante 48 h, se pesaron y se almacenaron.

3.2.5. Métodos de análisis de suelos

Para la caracterización y análisis de los suelos empleados en los ensayos de cultivo se emplearon las mismas técnicas de determinación de: carbono orgánico (CO), potasio (K) y fósforo (P) asimilables; descritas en el apartado 3.2.2 sobre “Métodos de caracterización de los posos de café y sus hidrochars”. El resto de la metodología empleada se detalla a continuación.

Color

Se utilizó el sistema de notación Munsell.

Granulometría

Se realizó en campo por un método de sedimentación empleando para ello el módulo de textura del kit de análisis de suelos Lamotte.

pH

Se analizó en una proporción 1:2.5 (p:v) de suelo y agua destilada. La mezcla formada se agitó durante 1 h y se realizó la medida con un pH-metro calibrado GLP 21 marca Crison®.

Conductividad eléctrica

Con un conductímetro GLP 31 marca Crison® a 25 °C se analizó el extracto líquido obtenido por filtración de la proporción 1:2.5 (p:v) del suelo y agua destilada del apartado anterior.

Nitrógeno total

El nitrógeno total contenido en el suelo se determinó mediante el método de Kjeldahl.

Carbonato cálcico equivalente

Se realizó la determinación mediante el método del calcímetro de Bernard. El contenido total de carbonatos del suelo se expresó como porcentaje de carbonato cálcico equivalente (%CaCO₃).

Zn y Fe asimilables

El Fe y el Zn disponibles en el suelo se extrajeron por el método de Lindsay y Norvell (1978). Este método utiliza una solución extractante de ácido dietilentriamino pentacético (DTPA). Al igual que en los bio-productos, el contenido mineral de los extractos obtenidos se determinó mediante dos métodos:

- Espectrometría de absorción atómica (AAS) (Varian SpectraA, 140. Mulgrave Victoria, Australia).
- Espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente PerkinElmer® Avio500 (ICP-OES; Waltham, MA, USA).

Retención de agua

Se utilizó el método de la membrana de Richards para calcular el porcentaje de retención de agua a -33 kPa, denominada capacidad de campo, y a -1500 kPa, denominada punto de marchitamiento permanente.

3.2.6. Métodos de análisis de las plantas

Peso fresco y Peso seco

Al término de cada ensayo de cultivo se cosechó toda la parte comestible de la lechuga (hojas). Las muestras se pesaron (peso fresco, PF), posteriormente se lavaron con agua destilada, se secaron a 60 °C por 24 h y se pesaron nuevamente (peso seco, PS).

Contenido de nutrientes minerales

La mineralización del material vegetal seco y molido se realizó en un digestor de microondas Muliwave 5000 (Anton Paar) con HNO₃ (65%) y H₂O₂ a 180 °C. El contenido mineral de los extractos anteriores se determinó mediante dos métodos:

- Espectrometría de absorción atómica (AAS) (Varian SpectraA, 140. Mulgrave Victoria, Australia).
- Espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente PerkinElmer® Avio500 (ICP-OES; Waltham, MA, USA).

3.2.7. Evaluación de la biofortificación

Eficiencia de utilización

La eficiencia de utilización (EU) de los micronutrientes añadidos al suelo, llevada a cabo por las plantas, se calculó de acuerdo con la fórmula propuesta por Zhao et al. (2019):

$$EU (\%) = \frac{\text{Toma en el tratamiento} - \text{Toma en el control}}{\text{Micronutriente añadido}} \times 100 \quad (7)$$

Eficiencia de reserva disponible

La eficiencia de reserva disponible (ERD), entendida como el porcentaje del micronutriente añadido al suelo que permanece en este, pero de forma asimilable para las plantas, también se calculó de acuerdo con la fórmula propuesta por Zhao et al. (2019):

$$ERD (\%) = \frac{\text{Extraíble en tratamiento} - \text{Extraíble en control}}{\text{Micronutriente añadido}} \times 100 \quad (8)$$

Factor de transferencia

Finalmente, según la fórmula propuesta por Almendros et al. (2013), calculamos el factor de transferencia (FT) para relacionar el contenido encontrado del micronutriente tanto en suelo como en planta:

$$FT = \frac{\text{Concentración total en planta}}{\text{Concentración extraída del suelo}} \quad (9)$$

3.2.8. Análisis estadístico

El análisis e interpretación de los datos recogidos en cada ensayo de esta tesis doctoral se realizó en base a la aplicación de varias pruebas estadísticas. Los análisis, así como las herramientas utilizadas fueron:

- Análisis de varianza (ANOVA) combinado con la prueba de Tukey para diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos. El nivel de significancia se fijó en el 95% ($p < 0.05$) en todas las pruebas. Se utilizó el programa SPSS 26.0 para Windows (IBM SPSS Inc., Nueva York, EE. UU).
- Análisis de componentes principales (PCA) para agrupar las muestras y visualizar su relación con los parámetros estudiados de suelo y planta. Este tratamiento estadístico se realizó en Origin b9.5.5409 (OriginLab Corp., Massachusetts, EE. UU.).
- Análisis de correlaciones lineales para respaldar los resultados de PCA. Se realizó el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson tomando en cuenta la significancia en el nivel 0.01. Para este análisis también se utilizó el programa SPSS 26.0 para Windows (IBM SPSS Inc., Nueva York, EE. UU).

3.3. Diseños experimentales

Las distintas etapas de desarrollo de la presente tesis doctoral se llevaron a cabo mediante una serie de ensayos. A su vez, cada ensayo estuvo basado en un diseño experimental ideado para alcanzar los objetivos específicos planteados. A continuación, se detalla cada uno de estos.

3.3.1. *Ensayo 1. Efecto de los parámetros de HTC sobre las propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de los hidrochars de SCG.*

Para evaluar el efecto que tienen la variación de los parámetros de temperatura y presión en las características de los residuos sólidos de segunda generación resultantes de la carbonización hidrotermal (HTC), denominados “hidrochars”, se planteó un diseño experimental con 3 valores de temperatura y 2 valores de presión distintos. Los 5 tratamientos derivados de las condiciones planteadas se detallan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Condiciones de temperatura y presión establecidas para la HTC.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Presión inicial (bar)
H1	175	0
H2	175	12
H3	180	0
H4	180	12
H5	185	0

Para este ensayo, la recuperación de los hidrochars se realizó mediante centrifugación (2500 rpm, 10 min) y decantado. Seguido, los bio-productos se lavaron 6 veces con 200 ml de agua destilada utilizando el mismo método de centrifugación y decantado.

Los hidrochars obtenidos se compararon con los SCG en función de sus propiedades físicas (morfología, superficie específica, distribución del tamaño de partícula), químicas

(análisis elemental, contenidos de K y P asimilables, polifenoles totales) y fisicoquímicas (pH, CE₂₅).

3.3.2. *Ensayo 2. Influencia de la temperatura en la composición de los residuos resultantes de la carbonización hidrotermal.*

Se plantea un nuevo ensayo que pretende estudiar la composición de los residuos, sólido (hidrochar) y líquido (licor), resultantes de la carbonización hidrotermal. Para ello, se establecieron tres temperaturas de ensayo de HTC: 160, 180 y 200 °C, con una presión inicial de 0 bar. Cada procedimiento se realizó por triplicado. Se recolectaron ambos residuos mediante filtración en vacío, sin ningún lavado o postratamiento adicional, y se almacenaron. La caracterización de los subproductos (**Figura 9**) se estableció en función de las perspectivas de aplicación futuras pensadas en este trabajo para cada uno, y de las cuales se discutirá en el apartado de “Resultados y Discusión”.

Residuo sólido (hidrochar)	•pH, CE ₂₅ , P y K asimilables, análisis proximal, análisis elemental, relación C/N, morfología, rendimiento, PT.
Residuo líquido (licor)	•Composición proximal, AT, PT, HMF, furfurales, AGCC.

Figura 9. Análisis empleados para la caracterización de los residuos sólido y líquido resultantes de la HTC a diferentes temperaturas.

3.3.3. Ensayo 3. Impacto de la aplicación de dos pretratamientos en la detoxificación y mejora estructural de los hidrochars de posos de café.

Con el objetivo de evaluar el efecto que tienen la aplicación de dos tratamientos previos a la carbonización hidrotermal (HTC), el lavado con etanol y el desgrasado, sobre los hidrochars respecto a: 1) la variación del contenido de compuestos tóxicos y, 2) la mejora de la estructura, se estableció el diseño experimental que se detalla en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Diseño experimental de los tratamientos aplicados a los SCG previo a la HTC.

Residuo	Pretratamiento 1	Pretratamiento 2
Control	-	-
D	Desgrasado	-
L	Lavado	-
D-L	Desgrasado	Lavado
L-D	Lavado	Desgrasado

Los 4 diferentes residuos de SCG obtenidos después de la aplicación de los pretratamientos se sometieron a una carbonización hidrotermal a 160 °C. Los SCG sin ningún pretratamiento se utilizaron como control. Cada residuo se obtuvo por triplicado. Finalmente, se determinó el contenido de PT y %MG, se realizó un perfil lipídico y un análisis morfológico de los hidrochars.

3.3.4. Ensayo 4. Activación química de los hidrochars de posos de café para la mejora de su funcionalidad como bio-quelatos agrícolas.

En busca de la mejora de la funcionalidad de los hidrochars de SCG como bio-quelatos agrícolas, se evaluó la aplicación de un proceso de activación química previo a su funcionalización.

Para ello, los bio-productos: H160, H180 y H200 se activaron y después, cada uno, se funcionalizó con Zn y Fe. Se realizó lo mismo con los SCG para su posterior comparación. Se obtuvieron en total cuatro bio-productos activados: ASCG, AH160, AH180 y AH200. Tanto la activación como la funcionalización se realizaron por triplicado. Se calculó el rendimiento del proceso y se realizaron análisis morfológicos, físicos (RMN, índices estructurales, superficie específica), químicos (PT, Zn y Fe asimilables) y fisicoquímicos (pH, CE₂₅) de los bio-productos.

3.3.5. Ensayo 5. Evaluación de la aplicación de los hidrochars de posos de café como enmienda orgánica de suelos agrícolas.

El ensayo de cultivo se realizó con dos bio-productos: hidrochar obtenido a 175 °C (H175) e hidrochar obtenido a 185 °C (H185); y dos dosis: 1 y 2.5% (p:p). Se incluyó los SCG a las mismas dosis para efectos de comparación, además de un control general al que no se le adicionó ningún bio-producto. Se utilizó el suelo 2. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

En este ensayo se analizaron el peso fresco y el peso seco de las plantas, así como el contenido de macronutrientes (Ca, Na, K, Mg) y micronutrientes (Cu, Fe, Mn). Se analizaron también las características del suelo: pH, CE₂₅, CO (%), N Total (%), relación C/N, K y P asimilables.

3.3.6. Ensayo 6. Efectos de la adición de los hidrochars de posos de café funcionalizados con Zn y Fe (bio-quelatos) para la biofortificación agronómica de plantas comestibles

Se utilizó los siguientes bio-productos: hidrochar obtenido a 160 °C (H160) e hidrochar obtenido a 200 °C (H200). Se incluyeron también los SCG para efectos de comparación. El ensayo se complementó con los mismos tres bio-productos, pero funcionalizados con Zn y con Fe (bio-quelatos), dando como resultado 9 bio-productos en total. Se utilizó el Suelo 1. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Para estudiar la influencia de si la concentración del mineral o la cantidad de bio-quelato es más eficaz para la biofortificación de las plantas, se realizaron dos modalidades de aplicación de los bio-productos, para cada nutriente mineral:

- 1) Concentración fija de micronutriente de 10 mg/kg suelo (ensayo Zn-1, ensayo Fe-1)
- 2) Dosis fija de 0.5% de bio-producto (ensayo Zn-2, ensayo Fe-2)

Para el ensayo 1, se calculó la cantidad de cada bio-producto que había que añadir al suelo a partir de su contenido mineral después de la funcionalización (**Tabla 9**). Los productos no funcionalizados se utilizaron en una cantidad equivalente a los funcionalizados. La concentración final de minerales, así como las cantidades de bio-productos añadidos al suelo en cada tratamiento, se describen en la **Tabla 10**.

Tabla 9. Contenido de Zn y Fe asimilables de los SCG y los hidrochars funcionalizados, utilizados en el ensayo de biofortificación.

Bio-producto	Zn (mg/kg)	Fe (mg/kg)
SCG	6009	5886
H160	1748	3814
H200	332	2188

Se establecieron dos tipos de controles, uno general y dos específicos, que se detallan a continuación:

- Control General – “Control”: Suelo sin ningún bio-producto adicionado.
- Control específico 1– “Control-Zn”: Suelo + Quelato comercial etilendiaminotetraacetato de zinc (EDTA-Zn, 14% p:p).
- Control específico 2– “Control-Fe”: Suelo + Quelato comercial hierro etilendiamina-N,N'-bis (ED-DHA-Fe, 6% p:p).

Los quelatos comerciales se utilizaron en una concentración de 10 mg/kg de suelo. Estos fueron suministrados por Trade Corporation International, S.A.U. (Madrid, España). Ambos experimentos (Zn y Fe) se realizaron a diferentes tiempos debido a la capacidad de la cámara climática.

Los análisis llevados a cabo en planta fueron: peso fresco, peso seco; y en suelo fueron: pH, CE₂₅ y CO (%). Tanto en planta como en suelo se analizó el contenido del micronutriente ensayado (Fe o Zn). Adicional, se realizó el estudio de la movilización del micronutriente en el sistema suelo planta calculando los parámetros: eficiencia de utilización (EU), eficiencia de reserva disponible (ERD) y factor de transferencia (TF).

Tabla 10. Concentración de micronutrientes y cantidad de bio-producto añadido en cada tratamiento.

Tratamiento	Micronutriente (mg/kg suelo)	Bio- producto
<i>Ensayo Zn</i>		
Control	0	0
Control-Zn	10.00	0
SCG-1	0.02	0.17
H160-1	0.06	0.57
H200-1	0.35	3.01
SCG-Zn-1	10.00	0.17
H160-Zn-1	10.00	0.57
H200-Zn-1	10.00	3.01
SCG-2	0.05	0.5
H160-2	0.05	0.5
H200-2	0.06	0.5
SCG-Zn-2	30.05	0.5
H160-Zn-2	8.74	0.5
H200-Zn-2	1.66	0.5
<i>Ensayo Fe</i>		
Control	0	0
Control-Fe	10.00	0
SCG-1	0.19	0.17
H160-1	0.26	0.26
H200-1	1.16	0.46
SCG-Fe-1	10.00	0.17
H160-Fe-1	10.00	0.26
H200-Fe-1	10.00	0.46
SCG-2	0.57	0.5
H160-2	0.50	0.5
H200-2	1.27	0.5
SCG-Fe-2	29.43	0.5
H160-Fe-2	19.07	0.5
H200-Fe-2	10.94	0.5

SCG, posos de café; H160, hidrochar obtenido a 160 °C; H200, hidrochar obtenido a 200 °C; SCG-Zn o Fe, bio-quelatos de SCG; H160-Zn o Fe, bio-quelatos de H160; H200-Zn o Fe, bio-quelatos de H200. Diferentes números en el nombre de los bio-quelatos indican la modalidad de aplicación.

3.3.7. Ensayo 7. Uso de los SCG y sus hidrochars activados y funcionalizados como bio-quelatos para la biofortificación agronómica de Fe y Zn.

Los bio-productos activados que se funcionalizaron con Fe y Zn fueron: hidrochar obtenido a 160 °C (AH160), hidrochar obtenido a 180 °C (AH180) e hidrochar obtenido a 200 °C (AH200). Se incluyeron también los SCG activados para efectos de comparación (ASCG). Los contenidos minerales finales se muestran en la **Tabla 11**. En total, se ensayó la aplicación de 8 bio-quelatos en el Suelo 2. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado.

Tabla 11. Contenido de Zn y Fe asimilables de los SCG y los hidrochars funcionalizados, utilizados en el ensayo de biofortificación.

Bio-producto	Zn (mg/kg)	Fe (mg/Kg)
ASCG	14592.2	11547.5
AH160	14478.0	12829.1
AH180	19819.2	16149.3
AH200	14854.7	19453.5

Para evaluar el efecto de biofortificación y desempeño respecto a la toxicidad de los bio-productos activados y funcionalizados, se realizó una mezcla de bio-producto con el suelo al 0.2%, equivalente a 0.7 g. La dosis escogida se basó en los resultados obtenidos en el Ensayo 6. En este caso, la aplicación del fertilizante triple 15 se dividió en dos aplicaciones: día 0 y día 20 del ensayo, en cantidades de 0.338 g/kg para proporcionar N: 50 mg/kg, P: 22 mg/kg, K: 42 mg/kg.

Al igual que en el Ensayo 6 se establecieron dos tipos de controles, uno general y dos específicos, que se detallan a continuación:

- Control General – “Control”: Suelo sin ningún bio-producto adicionado.
- Control específico 1– “Control-Zn”: Suelo + Quelato comercial etilendiaminotetraacetato de zinc (EDTA-Zn, 14% p:p).

- Control específico 2- “Control-Fe”: Suelo + Quelato comercial hierro etilendiamina-N,N'-bis (ED-DHA-Fe, 6% p:p).

Los quelatos comerciales se utilizaron en una concentración de 10 mg/kg de suelo. Estos fueron suministrados por Trade Corporation International, S.A.U. (Madrid, España).

Los análisis llevados a cabo en planta fueron: peso fresco, peso seco; y en suelo fueron: pH, CE₂₅. Tanto en planta como en suelo se analizó el contenido de micronutrientes (Fe, Zn, Mn, Cu). Adicional, se realizó el estudio de la movilización del micronutriente en el sistema suelo planta calculando los parámetros: eficiencia de utilización (EU), eficiencia de reserva disponible (ERD) y factor de transferencia (TF).

Condiciones comunes de cultivo

Todos los ensayos *in vitro* (cámara climática), se llevaron a cabo aplicando los siguientes aspectos comunes:

- Macetas de PVC de 300 ml de capacidad cerradas con doble malla de fibra de vidrio en la base para evitar la pérdida de partículas finas.
- En todos los tratamientos se añadió al suelo un fertilizante triple 15 en cantidades de 0.675 g/kg de para proporcionar N: 100 mg/kg, P: 44 mg/kg, K: 84 mg/kg.
- Peso total de suelo y/o mezcla con bio-producto en cada maceta: 400 g.
- Trasplante de plántulas de lechuga de 30 días de edad.
- Riego: Calculados por ponderación. Entre la capacidad de campo y el punto de marchitez permanente del suelo utilizado (**Tabla 6**).
- Condiciones de crecimiento controladas: humedad relativa de 50-60%, temperatura de 22/18 °C (día/noche) y fotoperíodo de 12/12 h.
- Duración de los ensayos: 40 días.

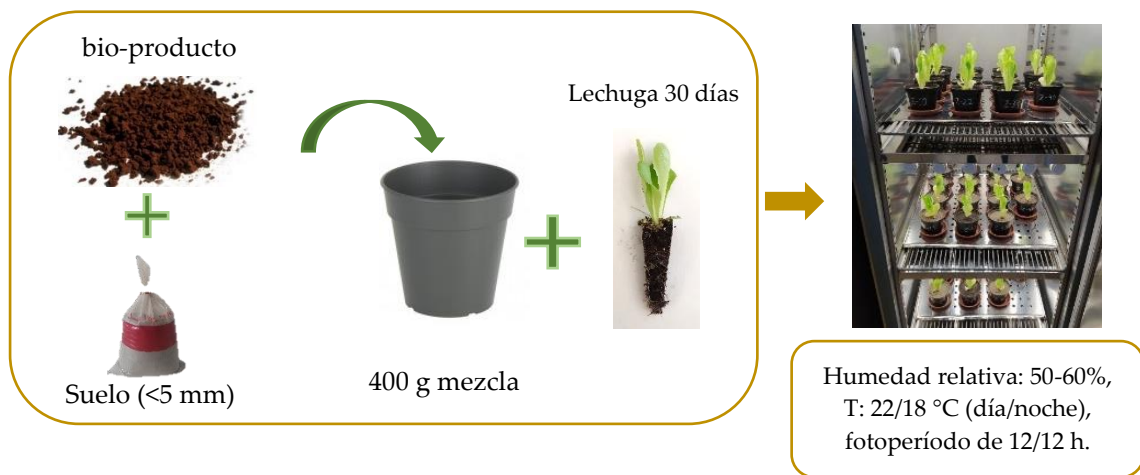
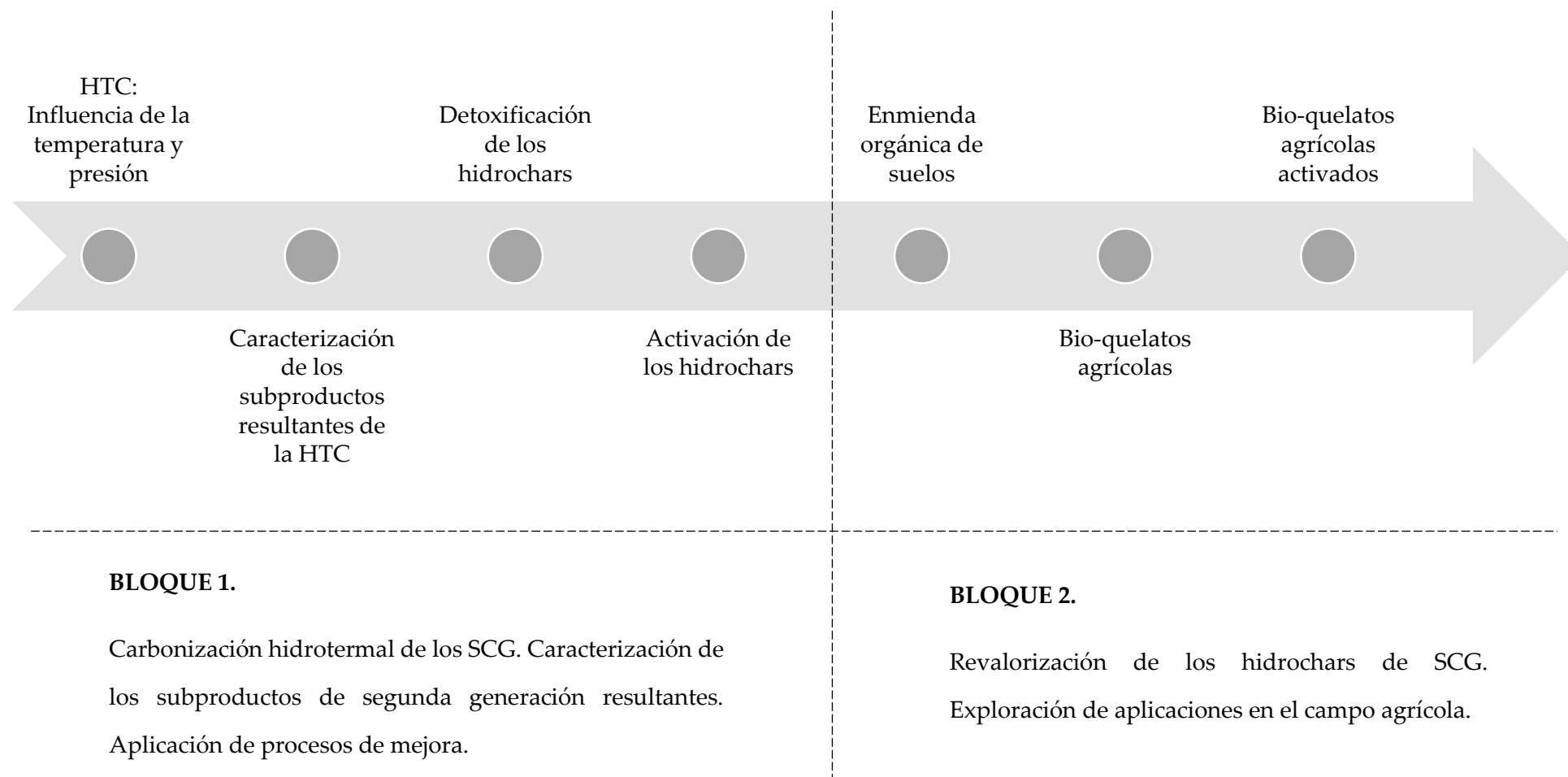


Figura 10. Esquema general de los ensayos de cultivo *in vitro*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esquema de organización del capítulo de resultados y discusión.



BLOQUE 1

Este bloque comprende el estudio de la carbonización hidrotermal de los SCG. Empieza por el estudio de los parámetros del proceso sobre las características del hidrochar resultante. Comprende también un análisis descriptivo de ambos subproductos, sólido y líquido, obtenidos a diferentes temperaturas de HTC para evaluar su potencial de revalorización. Además, se explora la aplicación de pretratamientos a los SCG para la obtención de subproductos menos tóxicos. Finalmente, concluye con la activación de las partículas de hidrochar, proceso clave para su uso en el campo agrícola.

4.1. Efecto de los parámetros de HTC sobre las propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de los hidrochars de SCG.

Preámbulo

Es ampliamente conocido que las características de los hidrochars están determinadas por la combinación de los parámetros de la HTC: temperatura, presión, tiempo de residencia y relación sólido:líquido (Zhang, et al., 2019). Un reporte interno de ensayos previos realizados en nuestro grupo de investigación ha determinado que una relación sólido:líquido del 10% (p:v) y un tiempo de reacción de 1 h son las condiciones más adecuadas para optimizar la extracción de MOS y otros metabolitos de interés a partir de los SCG. Sin embargo, para el mismo objetivo de revalorización, la variación de la presión no se ha tomado en cuenta y los rangos de temperatura ensayados (160-175 °C) todavía pueden ser expandidos con el fin de explorar los cambios que se suscitan, esta vez en los residuos sólidos. Según Cavali et al. (2023) este último es el parámetro más influyente sobre las características y el rendimiento del hidrochar.

En base a lo expuesto, a la escasa bibliografía sobre los efectos de la presión, y a la estrecha relación que guarda este parámetro con la temperatura, esta primera sección

tiene por objeto conocer la influencia tanto de la presión como de la temperatura sobre las propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de los hidrochars de SCG. Se presenta a continuación el desarrollo del Ensayo 1 planteado.

Propiedades químicas y fisicoquímicas

Las propiedades de los SCG y los hidrochars ensayados a diferentes temperaturas y presiones se muestran en la **Tabla 12**. El análisis elemental mostró cómo el proceso de carbonización de los SCG aumentó el contenido de C, H y ligeramente de N a partir de los 185 °C, mientras que el contenido de O disminuyó. Varios autores atribuyen estos aumentos y disminuciones de manera proporcional a la temperatura aplicada (Kim, et al., 2017; Afolabi, et al., 2020). En este ensayo, sin embargo, el contenido de C de los hidrochars obtenidos a 180 °C (H3, H4) se sale de esta tendencia ya que es un 2.04% menor que en los obtenidos a 175 °C. El control manual del proceso pudo haber influido en las variaciones que no se ajustan a estas tendencias fuertemente respaldadas por la bibliografía.

Aparte del contenido de C, las proporciones atómicas O/C y H/C también son utilizadas como un indicativo del grado de carbonización de los sustratos en los procesos de HTC. Así, a menor ratio de O/C y H/C, mayor es el grado de carbonización de los subproductos de segunda generación (Cavali, et al., 2023), lo que conlleva un mayor aromaticidad y menor polaridad (Zhang, et al., 2019). Los ratios reportados en la **Tabla 12** muestran disminuciones proporcionales a la temperatura aplicada, indiferentemente de la presión. Estos parámetros confirman la importancia de la temperatura en la obtención de subproductos con un mayor o menor grado de carbonización.

La relación C/N también se ve influenciada por la temperatura de HTC. Contrario a los ratios descritos anteriormente, este parámetro fue mayor en los hidrochars debido al aumento del contenido de C, pero al mismo tiempo a la estabilización del contenido de N, dando como resultado valores más elevados con la carbonización. Sin embargo, este aumento no superó el 13.9% en ninguno de los hidrochars respecto a los SCG. Tomando en cuenta las aplicaciones que pueden tener los hidrochars de SCG en el campo agronómico, los valores obtenidos de C/N pueden ser determinantes no sólo sobre el suelo sino también sobre la planta. El valor de C/N de todos estos residuos duplica el

valor óptimo establecido para suelos agrícolas que se sitúa en 10 (Kasongo, et al., 2013), pero está cercano a 25, el valor máximo recomendado para materia orgánica. Un valor mayor a 25 indicaría la probabilidad de inmovilización de N, mientras que un valor menor a 25 indicaría la probabilidad de mineralización del N (Rivelli & Libutti, 2022), por lo tanto, su dosificación debería ser controlada.

Tabla 12. Propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas de los SCG e hidrochars a diferentes temperaturas.

	SCG	H1	H2	H3	H4	H5
Análisis elemental (%)						
C	46.9	53.5	54.3	52.9	52.7	58.2
N	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.5
H	8.0	8.5	8.6	8.1	8.1	8.4
O*	43.0	35.9	35.0	36.9	37.1	30.9
O/C	0.92	0.67	0.80	0.70	0.70	0.53
H/C	0.17	0.16	0.16	0.15	0.15	0.14
C/N	22.3	25.5	25.5	25.2	25.1	23.28
pH	5.76	4.29	4.29	4.17	4.22	3.95
CE ₂₅ (dS/m)	1.15	0.08	0.08	0.06	0.08	0.08
P asimilable (mg/kg)	1274.2	197.2	225.1	142.7	192.0	181.7
K asimilable (mg/kg)	2474.5	31.3	35.0	29.1	25.4	32.7
Polifenoles totales (mg GAE/g)	7.4	15.0	18.3	16.9	17.2	20.1
D10 (um)	48	29	20	30	32	35
D60 (um)	313	215	210	218	226	237
D90 (um)	1017	617	525	607	632	711
Cu	6.5	7.4	10.4	7.2	7.1	6.8
Rango mínimo (um)	3.1	2.1	1.9	2.1	2.1	2.3
Rango máximo (um)	1905.7	1905.7	952.8	1905.7	1905.7	1905.7

*Calculado por diferencia. H1-H5, hidrochars obtenidos de acuerdo con las condiciones de la **Tabla 7**; GAE, ácido gálico equivalente; Cu, coeficiente de uniformidad; D10, D60, D90, diámetro para el cual el 10, 60 y 90% de las partículas son más finas, respectivamente.

El proceso de HTC disminuyó el pH, generando subproductos más ácidos. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Libra et al. (2011), quienes encontraron que la transformación de otros residuos vegetales en hidrochar provocó la disminución del pH por debajo de 5. La HTC también disminuyó la CE₂₅, debido al

lavado de sales producidas durante el proceso de lavado. La HTC y el posterior proceso de lavado también afectan los contenidos de P y K disponibles en los diferentes hidrochars de SCG, disminuyendo su contenido. Según Mayanga-Torres et al. (2017), los iones se liberan en la solución acuosa durante el proceso, lo que se traduce en una baja concentración en el residuo sólido. Este hecho es provocado por la alta capacidad de reacción del potasio con el agua (Lenntech BV, 2019) y la solubilidad favorecida de las formas asimilables de fósforo en medio ácido (Elrashidi, et al., 2001).

En cuanto al contenido de polifenoles totales, la carbonización hidrotermal provocó el incremento de su contenido, alcanzando un valor máximo de 20.1 mg GAE/g (H5), casi tres veces más que los SCG (**Tabla 12**). Estos compuestos se generan producto de la degradación de la lignina (Xiao, et al., 2012), la misma que ocurre a temperaturas de HTC cercanas a los 200 °C (Cavali, et al., 2023). La temperatura parece estar estrechamente ligada con este parámetro, lo que concuerda con lo reportado por Ballesteros et al. (2017). Además, los resultados obtenidos en este ensayo muestran valores ligeramente más elevados en los hidrochars obtenidos a una presión inicial de 12 bar (H1, H3) respecto a sus homólogos obtenidos a presión inicial de 0 bar (H2, H4). Un estudio realizado por Mayanga-Torres et al. (2017) parece respaldar lo encontrado, aunque con diferencias muy leves para presiones de HTC de 22.5 y 30 MPa.

En un ensayo previo realizado por nuestro grupo de investigación (Cervera-Mata, et al., 2020), se obtuvo un contenido de PT de 14 mg GAE/g para un hidrochar de SCG obtenido a 180 °C. Dicha cantidad de polifenoles obtenidos por los autores con el mismo equipo y metodología usados en este trabajo es menor que los obtenidos en la **Tabla 12**. Este hecho podría deberse a que en este ensayo los hidrochars se lavaron después de su recuperación y que en el estudio anterior no se lavó el hidrochar (solo se filtró y secó). El lavado de los hidrochars no eliminó los polifenoles, sino que los concentró.

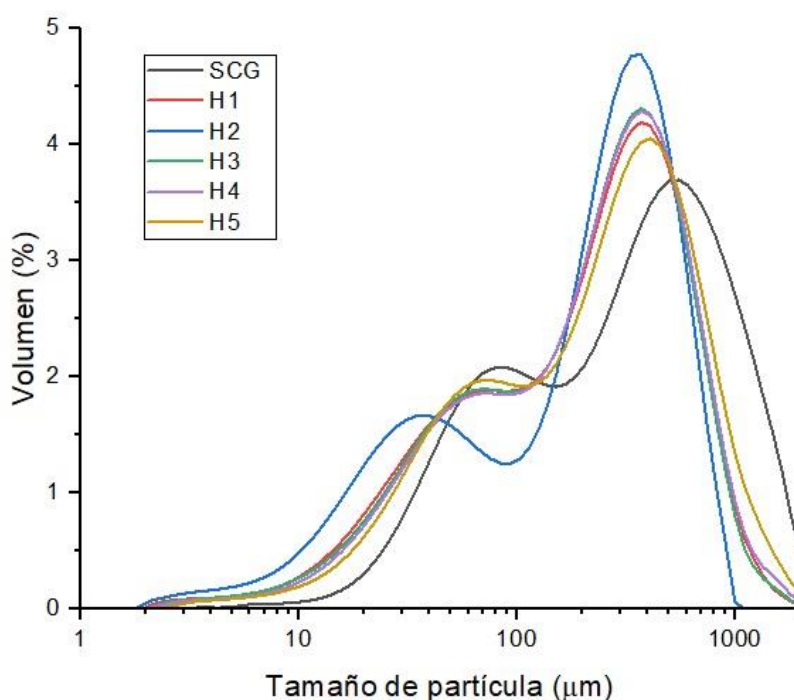


Figura 11. Distribución del tamaño de partícula de los SCG e hidrochars lavados obtenidos a diferentes condiciones de temperatura y presión.

Propiedades físicas

La **Figura 11** muestra la distribución del tamaño de partículas de los SCG y hidrochars. Todos los bio-productos presentan una distribución bimodal. Los hidrochars presentan una curva de distribución de tamaño de partícula que se desplazó hacia la izquierda, lo que indica una reducción del tamaño de las partículas durante el proceso de carbonización. Los SCG tienen un tamaño de partícula que oscila entre 3 y 1905 mm siendo los más frecuentes los de tamaño 552 mm. Estos resultados se alinean con estudios previos de los SCG (Barbanera & Muguerza, 2020). Los hidrochars por otro lado, tienen un rango de tamaño de partícula entre 2 y 1906 mm, siendo los más frecuentes los de tamaño 371 mm para H1 – H4 y 410 mm para H5. Estos datos indican una reducción del tamaño de partícula producto de la carbonización. La ligera tendencia al aumento del tamaño de partícula por parte de H5, en comparación con el resto de los tratamientos, podría explicarse por el lavado del hidrochar que pudo haber arrastrado

las partículas coloidales más pequeñas. Sin embargo, esta hipótesis no puede ser corroborada debido a la falta de trabajo sobre este tema.

Otros parámetros medidos fueron D10, D60 y D90, así como el Cu derivado del cociente entre D60 y D10 (**Tabla 12**). La mayor diferencia entre ambos productos se encuentra en el D90, siendo este valor un promedio del 64.5% más alto en los SCG que en los hidrochars, lo que soporta la marcada reducción del tamaño de partícula provocada por la HTC. Este hecho también se ha visto reflejado en la misma proporción en el caso del D10 y en un 41.5% en el caso D60. En cuanto al Cu, este factor es superior en los hidrochars que en los SCG, aunque decrece con la temperatura.

Tabla 13. Valores de superficie específica de los SCG e hidrochars H2 y H4.

Bio-producto	Superficie Específica (m ² /g)
SCG	0.79 ± 0.03
H2	8.14 ± 0.05
H4	17.16 ± 0.03

La reducción del tamaño de las partículas estuvo acompañada de un aumento de la superficie específica (**Tabla 13**). Las muestras de hidrochars analizadas (H2 y H4) fueron sometidas a las mismas condiciones de presión, pero diferente temperatura (**Tabla 8**), lo que lleva a relacionar la superficie específica directamente con la temperatura aplicada en este estudio. Los resultados de la **Tabla 13** muestran que esta propiedad de las partículas de SCG aumenta 8 veces con la menor temperatura de HTC ensayada (175 °C) y que, a su vez, este valor se duplica al aumentar 5 °C la temperatura (180 °C). Las diferencias de superficie específica encontradas entre los SCG y los hidrochars se corroboran con el aumento de la porosidad, evidenciado en el análisis morfológico realizado mediante SEM (**Figura 12**). La **Figura 12A** muestra una partícula de SCG donde su cutícula permanece sin cambios, mientras que la partícula de hidrochar (**Figura 12B**) muestra una estructura más abierta, como resultado de la reacción de descomposición termolítica, fragmentación y desvolatilización, características del proceso de HTC

(Afolabi, et al., 2020). Se observa que los poros preexistentes en las partículas de SCG adquieren mayor definición y profundidad después de la carbonización. Castro et al. (2011), reportan resultados similares para partículas de SCG tratadas a temperaturas altas (550-800 °C) con vapor de agua y N₂, lo que también lleva a relacionar directamente el buen desarrollo de la porosidad de la partícula con la temperatura aplicada. Estos cambios estructurales en los hidrochars sugieren que estos subproductos podrían mejorar la interacción con las partículas sólidas del suelo para formar agregados con menor tendencia al agrietamiento y aumentar la capacidad de aireación y retención de agua, ventajas ya atribuidas a la adición de SCG al suelo en un ensayo realizado por Cervera-Mata et al. (2019).

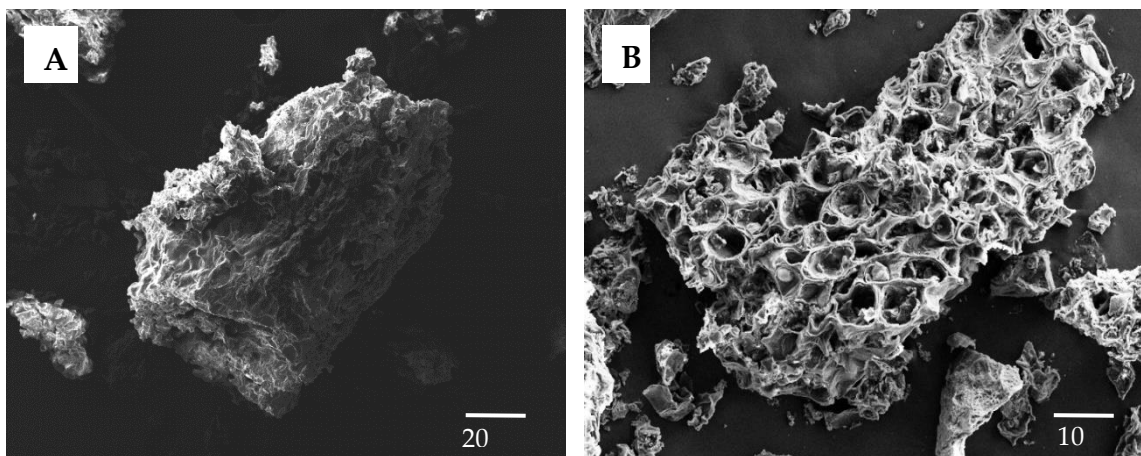


Figura 12. Imágenes SEM de partículas de A) SCG y, B) hidrochar obtenido a 185 °C (H5).

Consideraciones finales

Este ensayo ha proporcionado valiosa información acerca del proceso de HTC de los SCG y sus principales cambios. Se concluye que la aplicación de este proceso de carbonización a este residuo altera sus propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas. Los hidrochars resultantes tienen menor pH, conductividad eléctrica, contenido de P y K asimilables y tamaño de partícula. Por otro lado, presentan un aumento del contenido

de polifenoles totales, superficie específica y relación C/N. Todas las variaciones mencionadas se ven proporcionalmente afectadas por la temperatura de HTC aplicada, pero poco o nada se ha visto la influencia de la presión, excepto por el contenido de polifenoles totales.

4.2. Influencia de la temperatura en la composición de los residuos resultantes de la carbonización hidrotermal.

Preámbulo

En base a diversos estudios de optimización de la producción de azúcares provenientes de los SCG mediante hidrólisis ácida (Mussatto, et al., 2011), procesos físicos basados en la extracción únicamente con agua caliente comprimida (Asano, et al., 2003; Passos & Coimbra, 2013), y de los resultados obtenidos en el Ensayo 1 de este trabajo sobre la influencia de los parámetros de HTC, esta sección está orientada hacia la caracterización de ambos subproductos resultantes de la carbonización hidrotermal de los SCG: sólido (hidrochar) y líquido (licor), con el fin de encontrar las condiciones óptimas para su revalorización utilizando como único parámetro variable la temperatura. La bibliografía también respalda el papel determinante de este parámetro respecto a los principales cambios físicos, químicos y fisicoquímicos en las propiedades de los hidrochars (Afolabi, et al., 2020) que, a consecuencia, modificará también la composición de los licores de HTC. A continuación, se presenta el análisis correspondiente al Ensayo 2.

4.2.1. Residuo sólido

Propiedades físicas

Las tres temperaturas ensayadas en esta sección conllevan sucesivas transformaciones en los SCG. Según Cavali et al. (2023), la formación de hidrochars a partir de material lignocelulósico empieza con la degradación de la hemicelulosa que ocurre cerca de los

180 °C. A partir de esta temperatura hasta por encima de los 200 °C, se degradan las cadenas largas de celulosa dando lugar a oligómeros que posteriormente se hidrolizarán liberando monómeros de azúcar. Sin embargo, cuando las temperaturas de HTC superan los 200 °C, algunas pequeñas fracciones de lignina empiezan a disolverse en el agua, dando como resultado un residuo más degradado.

Estos cambios en la estructura de la materia prima hasta la obtención del hidrochar pueden evidenciarse en la **Figura 13**. El aumento de la porosidad después de la aplicación de la HTC vista anteriormente (**Figura 12**) fue evidente también en esa ocasión. Sin embargo, dicha porosidad no está presente en la totalidad de las partículas. Tampoco se observa una relación directa entre el aumento de la porosidad y el aumento de la temperatura, como lo establece Dieguez-Alonso, et al. (2018). Esto puede deberse al tipo de biomasa utilizada y su composición. En el caso de los SCG, producto de la agitación y las altas presiones alcanzadas durante la carbonización hidrotermal (~13-17 bar) el material de degradación no se libera, sino que se queda atrapado en la estructura de los hidrochars, como se muestra en detalle en la **Figura 14B**. Resultados similares de análisis SEM de un hidrochar de SCG obtenido a 200 °C reportó Cervera-Mata et al. (2022).

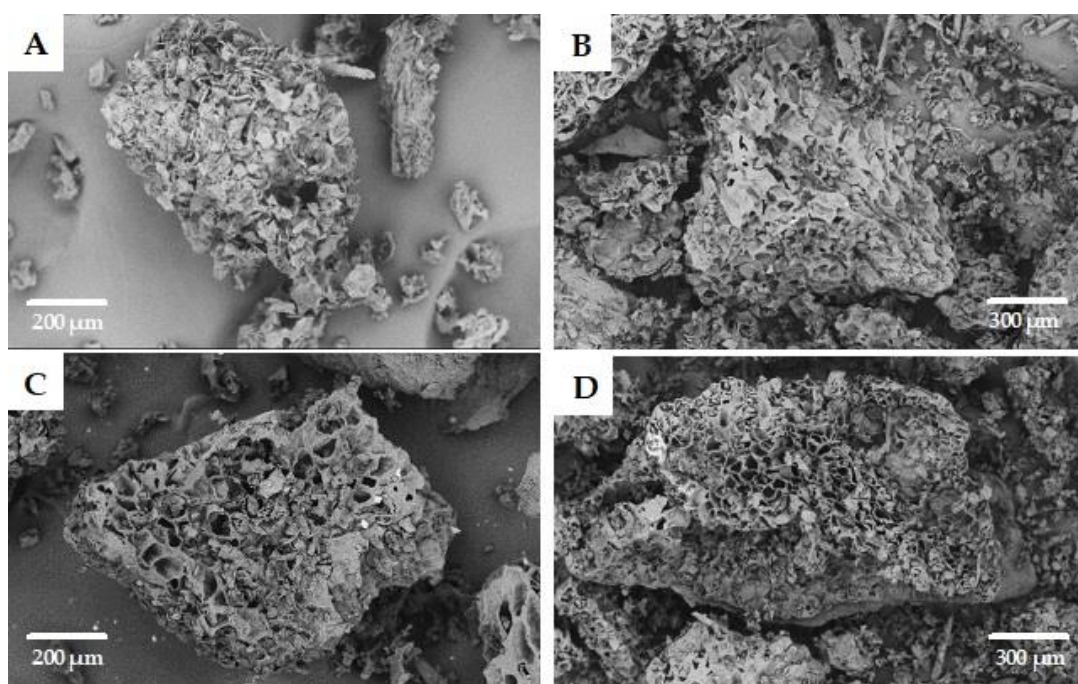


Figura 13. Imágenes SEM de partículas de A) SCG, B) H160, C) H180 y D) H200.

Por otro lado, lo que si se aprecia con el aumento de la temperatura es la disminución de las paredes que forman los poros. La **Figura 14** muestra esta diferencia al pasar de una temperatura de HTC de 160 °C (7-8 μm , **Figura 14A**) a 200 °C (3-4 μm , **Figura 14B**), una reducción del 50% entre la mínima y máxima temperatura ensayada. Según los procesos de degradación recién descritos, podemos entonces asumir que las paredes de los poros en el caso de H200 (**Figura 14B**), están compuestas mayormente de lignina. Resultados similares obtuvieron Passos & Coimbra (2014) al someter los SCG a un proceso físico semejante a una HTC, a una temperatura de 200 °C.

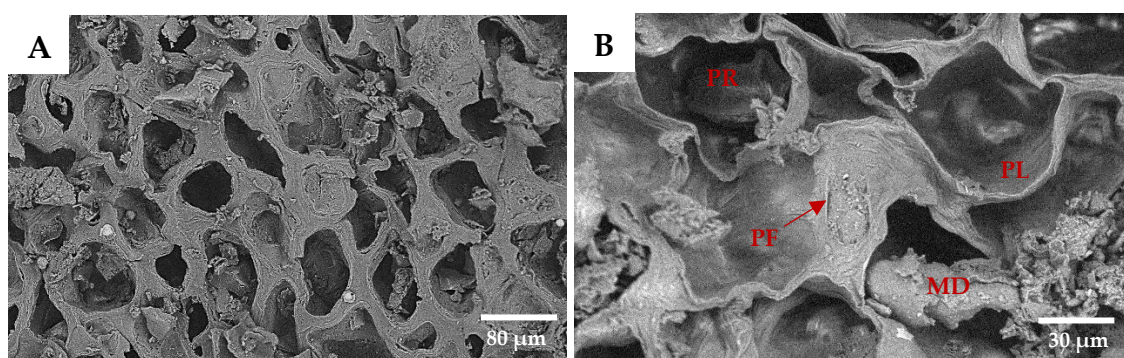


Figura 14. Imágenes SEM de partículas de A) H160 en el que se observan poros con paredes de aproximadamente 7-8 μm de grosor, y B) H200 con paredes de entre 3-4 μm de grosor. Se observa a detalle distinta porosidad: poros rellenos (PR) con material de degradación y poros en formación (PF).

La degradación de la estructura lignocelulósica no sólo influye en la transformación física de los residuos, sino que también afecta directamente el rendimiento del proceso de HTC. La **Figura 15** muestra una reducción aproximada del 10% del rendimiento cada vez que la temperatura se eleva 20 °C; por lo tanto, existe una clara relación inversa entre este parámetro y la temperatura aplicada. A mayor grado de carbonización, menor recuperación en peso del material (Ramón-Gonçalves, et al., 2019). Según Zhang et al. (2019), la carbonización hidrotermal produce rendimientos que oscilan entre el 40 y 70%. Los datos obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de dicho rango.

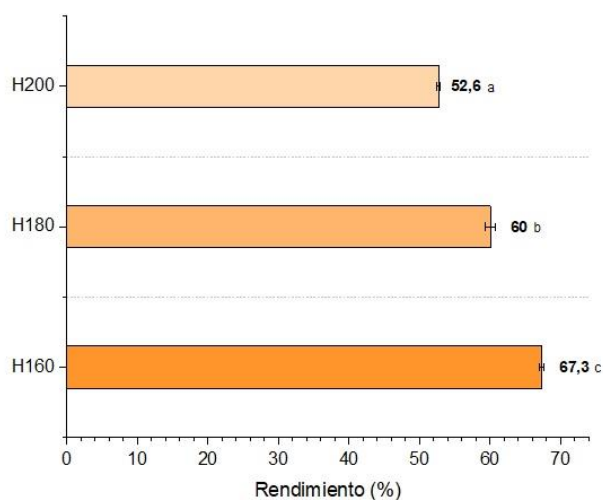


Figura 15. Rendimiento de los hidrochars obtenidos a diferentes temperaturas de HTC.

La disminución del tamaño de partículas evidenciada en el ensayo anterior (**Figura 11**) también sustenta la disminución del rendimiento y comparte relación con los demás cambios físicos provocados por el aumento de la temperatura de HTC. Esta relación se resume en la **Figura 16**.

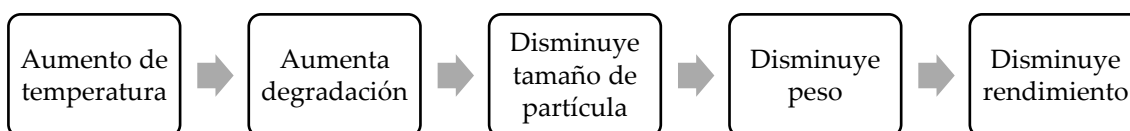


Figura 16. Efectos físicos sucesivos y consecuentes producidos por el aumento de la temperatura de HTC.

Propiedades químicas y fisicoquímicas

El análisis elemental de cada hidrochar se alinea con lo encontrado y discutido en el apartado 4.1 con relación a la temperatura aplicada. Respecto al aumento del contenido de carbono, se tiene también por defecto el aumento de la relación C/N. La disminución

del pH, la CE_{25} y los contenidos de P y K asimilables también se evidencian en proporción a la temperatura de HTC aplicada. Estas características son fundamentales para caracterizar las enmiendas orgánicas, debido a la importancia de estas propiedades fisicoquímicas en suelos agrícolas.

Por otro lado, el aumento de polifenoles totales (PT) es mucho más evidente en el hidrochar obtenido a 200 °C (H200) (**Tabla 14**). Este hidrochar tiene 1.5 veces más PT que el hidrochar obtenido a 185 °C (H185) del ensayo anterior (20.1 mg GAE/g, **Tabla 12**), y quintuplica el contenido inicial de los SCG. De acuerdo con Xiao et al. (2012), la presencia y el aumento de polifenoles totales en los productos de la carbonización hidrotermal de material lignocelulósico resulta de la degradación de la lignina, lo que concuerda con el aumento de la temperatura aplicada hasta los 200 °C alcanzados en este ensayo. La lignina es una macromolécula amorfa compleja compuesta principalmente por unidades monoméricas de fenilpropano entrelazadas mediante enlaces éter y carbono-carbono. Durante el proceso de HTC, las reacciones de deshidratación, descarboxilación y desmetanización dan lugar a la formación de compuestos fenólicos, así como de otros subproductos que se liberan principalmente en el residuo líquido, de los que se hará referencia más adelante.

Aparte de la degradación de la lignina, el aumento del contenido de PT también se ve influenciado, en este caso, por la especial composición de los SCG como materia prima. Este residuo agroalimentario posee melanoidinas que se han formado durante los procesos de tueste y posterior preparación de la bebida de café, como resultado de la reacción de Maillard (Rufián-Henares & De La Cueva, 2009). Estos compuestos también se degradan en el proceso de carbonización hidrotermal y dan lugar a la formación de moléculas cortas de compuestos fenólicos (Wang, et al., 2021). Debido a la naturaleza orgánica de estas moléculas, no se disuelven completamente en el agua, sino que gran parte de estas se quedan en el residuo sólido. Esta característica de los hidrochars obtenidos a altas temperaturas puede calificarse como “negativa” si este residuo es destinado para su aplicación en el suelo debido a su ya conocido efecto fitotóxico (Leifa, et al., 2000; Hardgrove & Livesly, 2016; Cervera-Mata, et al., 2018).

Tabla 14. Propiedades químicas y fisicoquímicas de los SCG y los hidrochars obtenidos a diferentes temperaturas de HTC.

	SCG	H160	H180	H200
Análisis elemental (%)				
C	47.4	52.0	54.3	62.6
N	2.2	2.2	2.1	2.5
H	7.8	8.1	8.6	7.6
O*	42.6	37.7	43.6	27.3
Análisis proximal (%)				
Carbón fijado	13.97	15.48	16.99	26.02
Materia volátil	85.02	83.92	82.82	73.42
Ceniza	1.01	0.60	0.19	0.56
Contenido de humedad (%)	7.53	3.58	3.52	3.46
C/N	21.5	23.6	25.9	25.3
pH	5.5	4.6	4.4	4.0
CE ₂₅ (dS/m)	1.09	0.68	0.58	0.83
P asimilable (ppm)	1274.2	384.0	289.5	342.1
K asimilable (ppm)	3561.7	1262.4	1702.2	1507.9
Polifenoles totales (mg GAE/g)	6.6	10.2	19.1	32.4

*Calculado por diferencia.

El análisis proximal de los SCG reveló un contenido del 13.97% de carbón fijado y un 85.02% de materia volátil (**Tabla 14**). Afolabi et al. (2020) y Kim et al. (2017) encontraron valores más altos de carbón fijado y valores más bajos de materia volátil. Estas discrepancias corroboran la variabilidad del SCG como materia prima, lo que generalmente dificulta la comparación de los resultados obtenidos en diferentes estudios. Cuando los SCG se sometieron al proceso de HTC, el carbón fijado aumentó hasta un 2 y 3% a temperaturas de trabajo de 160 y 180 °C, respectivamente; sin embargo, a una temperatura de 200 °C, este valor aumentó un 200% respecto a los SCG. La materia volátil, el contenido de cenizas y humedad, por otro lado, disminuyeron conforme a la temperatura aplicada. Estas diferencias entre SCG e hidrochars son similares a las reportadas por otros autores. Según Cavali et al. (2023), las altas temperaturas de HTC favorecen las reacciones de deshidratación y descarboxilación que disminuyen la materia volátil del hidrochar. Además, mejoran la fragmentación del residuo remanente mediante procesos de aromatización y repólimerización, lo que aumenta el contenido de

carbón fijado del hidrochar. Este aumento es de especial importancia ya que la carbonización hidrotermal genera un subproducto más estable que el residuo original. Esta estabilidad depende de la temperatura del proceso y está definida por las formas de carbono presentes en el hidrochar: lábil o recalcitrante. Por lo tanto, H200 tendrá formas de carbono más recalcitrantes y con propiedades más similares a un biochar que H160 o H180. Cervera-Mata et al. (2022) aseguran que un residuo con formas de carbono mayormente lábil, aplicado como enmienda orgánica al suelo, provoca un incremento de las emisiones de CO₂, disminuye la cantidad de carbono remanente, aumenta el contenido de carbono orgánico extraíble, aumenta la actividad biológica y, a consecuencia, provoca la inmovilización del N. Un comportamiento contrario se muestra con residuos más recalcitrantes. Sun et al. (2020) encontraron que la adición de hidrochar obtenido a 260 °C, proveniente de biomasa leñosa y de pastos, disminuyó la fracción de materia orgánica lábil del suelo y aumentó la fracción de materia orgánica estable con más compuestos aromáticos. Por lo tanto, se consideraría necesaria una investigación más profunda sobre los efectos de los hidrochars derivados de SCG en la estabilidad de la materia orgánica del suelo. Este es un aspecto fundamental para la restauración de suelos degradados con bajo contenido de materia orgánica.

Todos los resultados opuestos con otros reportes sobre el análisis proximal podrían atribuirse a los diferentes procesos (es decir, lavado, filtrado, secado, almacenamiento, etc.) aplicados al producto final. Por lo tanto, los hidrochars así obtenidos pueden variar mucho, aunque el proceso de HTC sea el mismo.

4.2.2. Residuo líquido

El licor resultante de la carbonización hidrotermal de los SCG es un subproducto que contiene los compuestos solubles liberados durante la degradación del material lignocelulósico. En la bibliografía, la aplicación de diversas técnicas de hidrólisis a altas temperaturas (150- 250 °C) en los SCG se ha llevado a cabo con el objetivo de obtener azúcares, principalmente manooligosacáridos (MOS), y compuestos fenólicos (Passos & Coimbra, 2014; Ballesteros, et al., 2017; Mayanga-Torres, et al., 2017).

En base a estos antecedentes, primero se realizó un análisis de composición proximal de los tres residuos (

Tabla 15), correspondientes a las tres temperaturas de HTC ensayadas. Los licores de HTC son muy diferentes a los SCG. En general, su componente mayoritario es agua y

	SCG	L160	%*	L180	%*	L200	%*
Kcal	412.33 ± 4.93	11.00 ± 3.61		12.00 ± 0.00		11.33 ± 3.06	
Humedad	5.78 ± 0.38	97.23 ± 0.86		96.90 ± 0.11		97.02 ± 0.78	
Cenizas	1.40 ± 0.04	0.11 ± 0.01	7.9	0.16 ± 0.02	11.4	0.12 ± 0.78	8.6
Proteína	13.71 ± 0.27	0.47 ± 0.05	3.6	0.58 ± 0.04	4.2	0.50 ± 0.03	3.6
Grasa	8.18 ± 0.76	0.03 ± 0.01	0.4	0.05 ± 0.07	0.6	0.03 ± 0.02	0.4
H. Carbono**	70.92 ± 0.76	2.15 ± 0.88	3.0	2.31 ± 0.10	3.3	2.33 ± 0.74	3.3

prácticamente no tienen materia grasa. Esta fracción se encuentra concentrada en los hidrochars debido a la naturaleza hidrofóbica de las moléculas lipídicas; a consecuencia de esto, su valor energético también se ha perdido en comparación con los SCG. Los hidratos de carbono representan la fracción más abundante, seguido de las proteínas y, por último, los minerales y otros compuestos secundarios (cenizas). Sin embargo, si analizamos el porcentaje que representan del residuo de origen (SCG), el orden se invierte (**Tabla 15**). Cuando los SCG se someten a una carbonización hidrotermal, dentro de un rango de temperaturas de 160 - 180 °C, se produce una mayor liberación de minerales (~9%), seguido de proteínas (~4%) y finalmente azúcares (~3%). La fracción mineral podría estar constituida mayormente por potasio, fósforo y magnesio, ya que son los elementos más abundantes en los SCG (Mussatto, et al., 2011) pero que también tienen una alta solubilidad. Este análisis primario no revela influencia alguna de la temperatura en la variación de la composición de macroelementos de los licores de HTC.

Tabla 15. Análisis de composición proximal de los licores de HTC de SCG a diferentes temperaturas, expresados como porcentajes (%) en base de 100 g o 100 ml.

	SCG	L160	%*	L180	%*	L200	%*
Kcal	412.33 ± 4.93	11.00 ± 3.61		12.00 ± 0.00		11.33 ± 3.06	
Humedad	5.78 ± 0.38	97.23 ± 0.86		96.90 ± 0.11		97.02 ± 0.78	
Cenizas	1.40 ± 0.04	0.11 ± 0.01	7.9	0.16 ± 0.02	11.4	0.12 ± 0.78	8.6
Proteína	13.71 ± 0.27	0.47 ± 0.05	3.6	0.58 ± 0.04	4.2	0.50 ± 0.03	3.6
Grasa	8.18 ± 0.76	0.03 ± 0.01	0.4	0.05 ± 0.07	0.6	0.03 ± 0.02	0.4
H. Carbono**	70.92 ± 0.76	2.15 ± 0.88	3.0	2.31 ± 0.10	3.3	2.33 ± 0.74	3.3

*Porcentaje que representa la fracción equivalente del contenido inicial presente en los SCG.

**Calculado por diferencia.

Para evaluar con más profundidad el potencial de fermentación de los licores resultantes de la HTC de los SCG, es importante conocer el contenido de azúcares totales (AT) de la fracción de hidratos de carbono. Los azúcares reductores son la principal e inmediata fuente de carbono para los microorganismos. Según se muestra en la

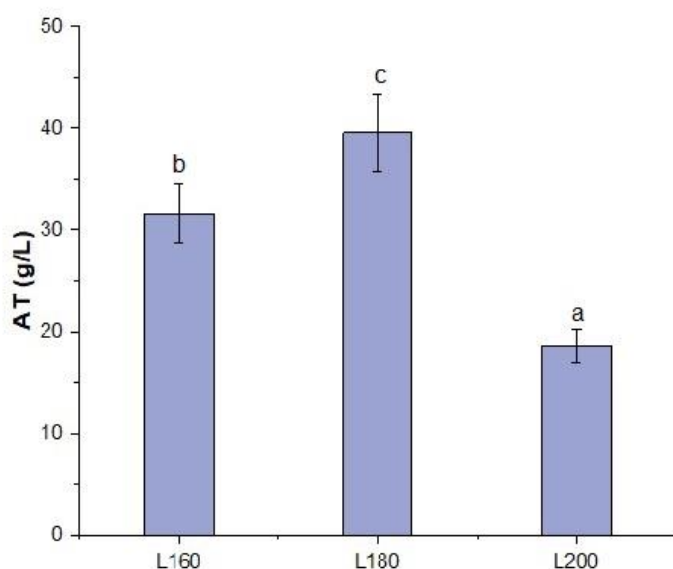


Figura 17, los licores tienen un contenido de AT de entre 18 y 39 g/L. La mayor liberación de azúcares se lleva a cabo a temperaturas de 180 °C y se observa una reducción del 53% del contenido cuando la temperatura se eleva a 200 °C. Un estudio de la hidrólisis ácida de los SCG realizada por Mussatto et al. (2011), reveló que el rango óptimo para la obtención de azúcares se encuentra entre los 140 y 180 °C, y que este contenido se incrementa juntamente con la temperatura, lo que concuerda con los resultados encontrados en este trabajo. En esa misma investigación, los autores encontraron que los azúcares presentes en los hidrolizados de SCG son casi exclusivamente glucosa, arabinosa, manosa y galactosa; siendo la manosa la más abundante, seguida de la galactosa.

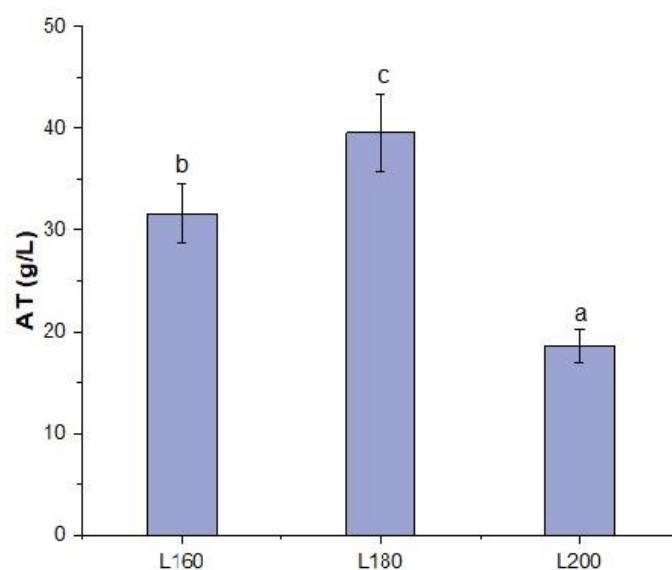


Figura 17. Contenido de azúcares totales (AT) de los licores de HTC de SCG obtenidos a diferentes temperaturas. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=3$). Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La reducción del contenido de AT en el licor obtenido a 200 °C (**Figura 17**) no concuerda con lo esperado tomando en cuenta que no sólo la hemicelulosa se degrada en el rango de temperaturas ensayadas, sino también parte de la celulosa. Otros autores que reportaron resultados similares señalan que a temperaturas altas (200 - 250 °C) los azúcares pueden sufrir degradación dando lugar a la formación de ácidos orgánicos (Mayanga-Torres, et al., 2017). Mussatto et al., (2011) también concuerda con esta declaración y alega que los azúcares pueden ser liberados y subsecuentemente degradados. Además, en el caso de la glucosa, este monómero puede polimerizarse en microesferas y pasar a formar parte de la fracción sólida (Cavali, et al., 2023).

En un sustrato de fermentación, no sólo el contenido de compuestos fermentables es importante sino también el contenido de compuestos tóxicos o que puedan afectar la viabilidad de los microorganismos. En los licores de la HTC generalmente se concentran los compuestos intermediarios, solubles y aromáticos, que se forman producto de la degradación del residuo lignocelulósico. Estos compuestos considerados como “tóxicos”, en el caso de los SCG, según Mussatto et al. (2011), son los furfurales,

hidroximetilfurfurales (HMF), polifenoles totales (PT) y ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

La **Figura 18** muestra los resultados del análisis del contenido de cada uno de estos compuestos en los licores de HTC. Existe una clara influencia de la temperatura sobre la producción de todos los compuestos tóxicos. En el caso de los HMF y AGCC (**Figura 18a, d**), su aumento es directamente proporcional a la temperatura aplicada, siendo L160 el de menor contenido y L200 el que más HMF y AGCC tiene. Por otro lado, los PT y furfurales (**Figura 18b, c**), tienen un comportamiento diferente. Su contenido aumenta de forma lineal con la temperatura hasta los 180 °C, pero a partir de ese punto, conforme sigue aumentando la temperatura, el contenido de ambos compuestos decrece.

Al igual que lo que sucede con la glucosa, según Cavali et al. (2023), los furfurales y los compuestos fenólicos también pueden polimerizarse y volver a depositarse en la superficie de los hidrochars. Esto no está descrito para el caso de los HMF, lo que explica su continua tendencia al aumento al superar los 180 °C (**Figura 18a**). Por otro lado, la producción de AGCC no sólo sigue el comportamiento lineal de aumento conforme a la temperatura, sino que su producción parece sufrir un impulso a partir de los 180 °C (**Figura 18d**). Estos resultados encajan con la disminución del contenido de azúcares vista en L200 (**Figura 17**) y el aumento de la producción específica de ácido acético (**Figura 19**) en comparación con el resto de AGCC por efecto de la temperatura.

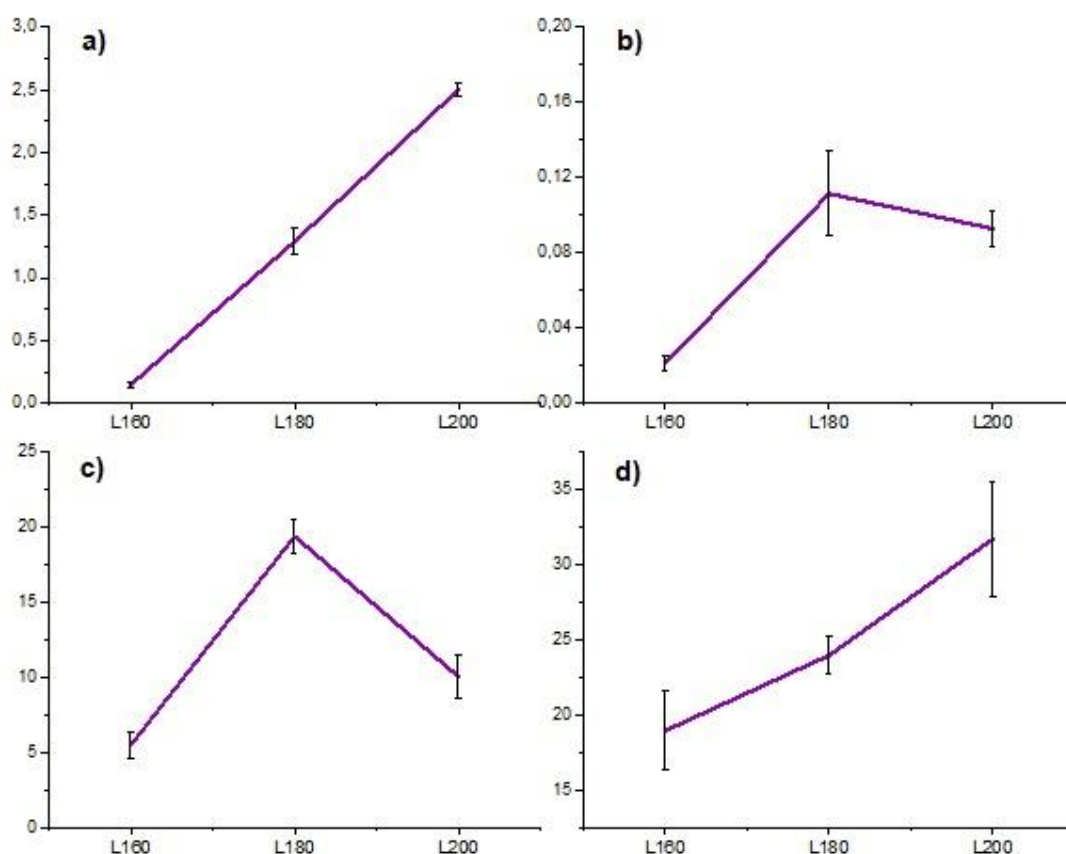


Figura 18. Contenido de a) hidroximetilfurfurales (HMF), b) furfurales, c) polifenoles totales (PT) y d) ácidos grasos de cadena corta (AGCC), expresados en g/L, de los licores de HTC de SCG obtenidos a diferentes temperaturas.

No existen en la bibliografía rangos generales de tolerancia de los microorganismos a estos compuestos; sin embargo, algunos trabajos hacen referencia al efecto de ciertos valores sobre determinadas especies. Leonel et al. (2020), por ejemplo, aseguran que valores superiores a 2.0 g/L de furfurales provocan inhibición del metabolismo para *K. marxianus* y la misma concentración, pero de HMF, para *C. guilliermondii*. Similares resultados reportaron Ruan et al. (2015) para el caso de *M. isabelina*, siendo resistente a valores de HMF de hasta 2.5 g/L, pero sólo hasta valores de 1 g/L de furfurales. Para esa misma cepa, los autores también reportaron tolerancia de 0.5 g/L a dos compuestos fenólicos: ácido ferúlico y ácido cumárico. Maass et al. (2016) tampoco reportó inhibición del crecimiento de *B. subtilis* DSM 3256 a concentraciones de polifenoles de 38 mg/L, pero

si una baja pureza del metabolito obtenido a causa de la presencia de estos compuestos en el medio.

Tomando en cuenta los valores encontrados en la bibliografía, el contenido de HMF encontrado en los licores de HTC de SCG podría ser tolerable para los microorganismos ya que ninguno supera los 2.5 g/L, aunque si lo iguala (L200, **Figura 18a**). El contenido de furfurales tampoco supera los citados. El valor máximo encontrado en los licores es de 0.11 g/L en L180 (**Figura 18b**). El contenido de PT, por el contrario, supera excesivamente los valores reportados, siendo la mínima concentración encontrada en este trabajo (L160: 5.55 g/L) 11 veces más alta que la reportada por Ruan et al. (**2015**), lo cual sugiere que todos los licores de HTC de SCG tienen un contenido de PT potencialmente tóxico.

Respecto al ácido acético, la concentración de este metabolito suele ser tomada en cuenta más para efectos del rendimiento de la fermentación (Leonel, et al., 2020). Es uno de los productos de la fermentación de azúcares, por lo tanto, ante una elevada concentración de este compuesto en el medio de cultivo se produce inhibición del crecimiento celular (Kim, et al., 2020). Los valores de ácido acético obtenidos en este trabajo para los licores de HTC se encuentran entre los 2.58 y 13.87 g/L (**Figura 19**). Si comparamos con los datos de una recopilación realizada por Leonel et al. (2020) del contenido de este compuesto en diversos hidrolizados de biomasa proveniente de bagazo de hoja de palma aceitera, cuyo valor máximo reportado es de 3.9 g/L, se puede decir que los licores obtenidos a partir de SCG tienen un contenido muy alto de ácido acético y que, por ende, un proceso de fermentación aplicado a este subproducto podría verse limitado. No obstante, la presencia de ácido acético en sustratos de fermentación se ha logrado sobrellevar mediante el uso de microorganismos como *P. putida* (Elmore, et al., 2020) o *M. isabellina* (Ruan, et al., 2015) que lo catabolizan de forma nativa.

Otra alternativa explorada para atenuar los efectos limitantes causados por la composición de los licores provenientes de material lignocelulósico es la aplicación de tratamientos de detoxificación previo a la fermentación. Algunos autores reportan resultados prometedores con el uso de carbón activado en la remoción de los compuestos tóxicos (Abdul Manaf, et al., 2018; Leonel, et al., 2020).

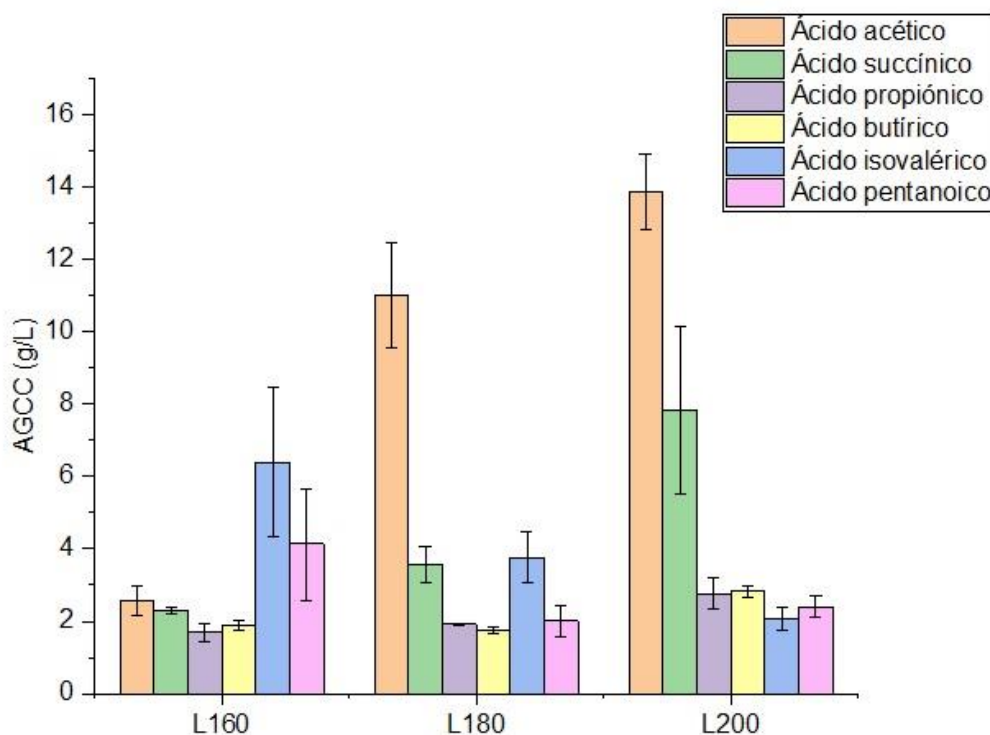


Figura 19. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) de los licores resultantes de la HTC de los SCG, obtenidos a diferentes temperaturas.

Para finalizar, es importante mencionar que la presencia combinada de los compuestos con potencial tóxico en el mismo residuo (HMF, furfurales, PT, ácido acético), independientemente de la concentración individual, puede igualmente causar inhibición de la fermentación debido a un efecto sinérgico (Ruan, et al., 2015).

Consideraciones finales

Las características físicas, químicas y fisicoquímicas de los hidrochars de SCG se ven atenuadas o acentuadas según la temperatura de HTC aplicada. Por lo tanto, la temperatura de trabajo se determinará en función del uso propuesto para la revalorización de estos subproductos. Desde una perspectiva agronómica, no existe

ventaja de un hidrochar sobre otro respecto a pH, CE₂₅, contenido de K y P asimilables; no obstante, H200 es un producto más estable para el suelo que H160, aunque es más tóxico (PT: 32.4 mg/g) y tiene el rendimiento más bajo (52.6%) entre los hidrochars ensayados. Por otro lado, H160 conserva mejor su estructura lo cual puede ser beneficioso para aumentar la superficie de contacto y mejorar la interacción con el microcosmos del medio. Además, su relativa baja toxicidad (PT: 10.2 mg/g) y mejor rendimiento (67.3%) puede brindar más alternativas para optimizar su uso, ya sea utilizando cantidades subtóxicas o aplicando tratamientos de detoxificación.

Respecto a la fracción líquida resultante del proceso de HTC, los licores de SCG tienen un alto contenido de azúcares reductores, pero también de compuestos tóxicos. La variabilidad de esta composición, más no de macronutrientes, está estrechamente relacionada con la temperatura aplicada. A diferencia de sus homólogos obtenidos a temperaturas más bajas, el licor obtenido a 200 °C (L200) presenta una inestabilidad dada por los fenómenos de polimerización llevados a cabo a esa temperatura y por lo tanto no se recomienda su uso. En todos los licores, el inhibidor más abundante es el ácido acético, seguido de los polifenoles totales, los HMF y finalmente los furfurales, que se encuentran en menor cantidad.

Analizando el potencial de fermentación de los tres licores, se puede concluir que L160 es el subproducto más viable para ser utilizado como sustrato de fermentación. A pesar de que L180 tiene la mayor cantidad de azúcares (39.5 g/L), también es el licor con mayor contenido de furfurales y polifenoles totales. L160 tiene un balance entre la cantidad de azúcares (31.6 g/L), imprescindibles para la fermentación, y compuestos tóxicos (HMF: 0.15 g/L; furfurales: 0.02 g/L; PT: 5.55 g/L; á. acético: 2.58 g/L), siendo estos últimos, los más bajos entre los tres licores obtenidos. La aplicación posterior de un proceso de detoxificación podría ser una alternativa para disminuir los inconvenientes provocados por la presencia de estos compuestos. Por otro lado, la riqueza de AGCC, no sólo de ácido acético (**Figura 19**), también podría ser otra opción de explotación de este subproducto de la HTC.

En resumen, tomando en cuenta las aplicaciones pensadas para el aprovechamiento de ambos subproductos, sólido y líquido, la temperatura de HTC más apropiada para los

SCG parece ser de 160 °C. Este parámetro podría variar en función del interés de explotación y de los resultados obtenidos en las distintas fases de prueba y desarrollo; sin embargo, en un cuadro general del proceso, se estima que a dicha temperatura habrá un equilibrio gasto-beneficio. Un análisis tecno-económico en base a los datos presentados en este trabajo brindaría mayor soporte a esta conclusión.

4.3. Impacto de la aplicación de dos pretratamientos en la detoxificación y mejora estructural de los hidrochars de posos de café.

Preámbulo

Las técnicas más utilizadas para la detoxificación de los SCG han sido el compostaje o vermicompostaje (Liu & Price, 2011; Santos, et al., 2017; Cervera-Mata, et al., 2020); sin embargo, los altos costes de aplicación acompañado de la dificultad para controlar la viabilidad de los organismos vivos hacen necesaria la exploración de técnicas más económicas y manejables, con vistas a ser parte de un diseño industrial de aprovechamiento de este residuo.

El lavado con etanol es un proceso que se ha empleado para la extracción de compuestos fenólicos a partir de posos de café (Panusa, et al., 2013). El residuo sólido resultante también ha sido aprovechado como precursor en la obtención de carbón activado (Alcaraz, et al., 2019; Ramón- Gonçalves, et al., 2019).

Por otro lado, debido al alto contenido de materia grasa de los SCG (8.18%,

	SCG	L160	%*	L180	%*	L200	%*
Kcal	412.33 ± 4.93	11.00 ± 3.61		12.00 ± 0.00		11.33 ± 3.06	
Humedad	5.78 ± 0.38	97.23 ± 0.86		96.90 ± 0.11		97.02 ± 0.78	

Cenizas	1.40 ± 0.04	0.11 ± 0.01	7.9	0.16 ± 0.02	11.4	0.12 ± 0.78	8.6
Proteína	13.71 ± 0.27	0.47 ± 0.05	3.6	0.58 ± 0.04	4.2	0.50 ± 0.03	3.6
Grasa	8.18 ± 0.76	0.03 ± 0.01	0.4	0.05 ± 0.07	0.6	0.03 ± 0.02	0.4
H. Carbono**	70.92 ± 0.76	2.15 ± 0.88	3.0	2.31 ± 0.10	3.3	2.33 ± 0.74	3.3

Tabla 15), se ha visto que la remoción de esta fracción puede ayudar a mejorar los procesos de carbonización de los SCG y resultar en contenidos de C y N más elevados, lo cual beneficia su utilidad como enmienda de suelos (Cervera-Mata, et al., 2022). Además, un mejor proceso de carbonización produce partículas con mayor porosidad (Dieguez-Alonso, et al., 2018), un aspecto importante para el acoplamiento del hidrochar al suelo y para mejorar la capacidad de intercambio catiónico e interacción con los microorganismos. El desgrasado también se ha utilizado como un pretratamiento para la obtención de azúcares a partir de SCG (Ballesteros, et al., 2015). Algunos autores encontraron que el contenido de azúcares puede aumentar hasta un 20.8% con la aplicación de este proceso antes de la hidrólisis (Kovalcik, et al., 2018).

Así, el estudio de la aplicación de una o ambas técnicas de forma combinada tuvo por objetivo analizar el efecto en la reducción de compuestos tóxicos, específicamente los compuestos fenólicos, y de lípidos, para mejorar las propiedades del hidrochar con vistas a una aplicación en el suelo. Los resultados del Ensayo 3 planteado para este fin se discuten a continuación.

Efectos sobre los bio-productos

La **Figura 20** muestra que no hubo una reducción del contenido de polifenoles totales (PT) en los hidrochars con la aplicación del lavado con etanol y/o desgrasado, con respecto a los SCG sin tratamiento previo (control). Esto puede deberse a que, a pesar de que el o los pretratamientos hayan podido remover gran parte de estos compuestos en el residuo inicial, durante el proceso de HTC se generan nuevos compuestos fenólicos producto de los procesos de degradación, como se ha venido evidenciando en las secciones anteriores.

Por el contrario, el contenido de materia grasa (MG) si se redujo significativamente ($p < 0.05$) en todos los casos, comparado con el control. La mayor reducción (60-62%) se obtuvo al combinar ambos tratamientos, desgrasado y lavado con etanol (D-L, L-D), en

orden indistinto; sin embargo, con la aplicación únicamente del desgrasado (D) se obtuvo una reducción del 52% de la MG en los hidrochars. La aplicación de un solo pretratamiento con una eficiencia cercana a la que se obtendría aplicando ambos, podría evaluarse con el objetivo de lograr la eficiencia económica y la reutilización sostenible de los SCG.

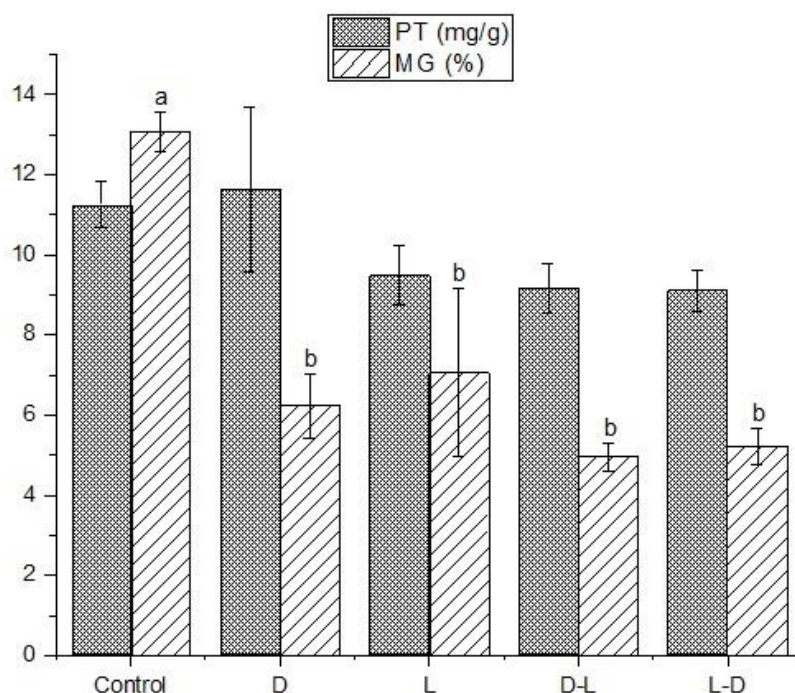


Figura 20. Contenido de polifenoles totales (PT) y materia grasa (MG) en los hidrochars obtenidos a 160 °C a partir de SCG previamente tratados. Nomenclatura de los residuos detallada en la (Tabla 8). Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=3$). Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las columnas sin ninguna letra no mostraron diferencias significativas.

Los polifenoles extraídos de los SCG se pueden utilizar para la producción de suplementos nutricionales, nuevos alimentos funcionales o aditivos cosméticos (Panusa, et al., 2013). De la misma manera, el aceite recuperado del proceso de desgrasado puede ser aprovechado para la producción de biodiesel o en nuevas formulaciones cosméticas

(Obruca, et al., 2014). La producción de biopolímeros por vía fermentativa utilizando los ácidos grasos como fuente de carbono también es una alternativa cada vez más explorada, especialmente para la producción de polyhydroxyalkanoate (PHA) (Obruca, et al., 2014; Kovalkik, et al., 2018) y 3-hidroxibutirato (PHB) (Campos de Bomfim, et al., 2022).

El análisis del perfil lipídico de los SCG y los hidrochars obtenidos en este ensayo se muestra en la **Tabla 16**. Se observa que el ácido más abundante es el palmítico, seguido del linoleico. En general, la proporción de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados es de 5:1:3, respectivamente, la cual se mantiene después de la detoxificación, pero con ligeras modificaciones. Colucci Cante et al. (2021) encontraron una abundancia invertida en el aceite de SCG, siendo el ácido linoleico el más abundante en lugar del palmítico. Puesto que en este trabajo no se analizó el aceite, sino únicamente el residuo sólido, durante el proceso de extracción pueden verse liberados unos ácidos más que otros, resultando en variaciones de composición.

Todos los residuos sólidos pretratados de este ensayo exhiben todavía un contenido considerable de MG (**Figura 20**). No se obtiene un desgrasado total sino parcial. Según Campos de Bomfim et al. (2022), la máxima extracción de aceite de los SCG podría alcanzar el 85-90% dependiendo de la técnica utilizada, pero con rendimientos entre el 6 y 20%. A pesar de que en este ensayo no se registró el rendimiento del proceso, la bibliografía señala que el rendimiento utilizando Soxhlet con n-hexano es del 15.3% para los SCG, aunque este puede variar en función de las condiciones del proceso, particularmente, la elección del solvente y la duración de la extracción (Campos-Vega, et al., 2015). Esta técnica, junto con la extracción con CO₂ supercrítico son las más utilizadas, siendo esta última la que ha reportado rendimientos más altos, pero con una relación costo-beneficio aún inviable para la industrialización. Una ventaja importante desde el punto de vista agronómico que se ha visto en la mejora de los SCG con el desgrasado es la reducción de la relación C/N. Este parámetro no se analizó en este ensayo, sin embargo, en la bibliografía se registra una disminución hasta un valor de 19.8, llegando a ser similar a las necesidades del suelo (20.0) (Campos-Vega, et al., 2015).

Respecto a la estructura de las partículas, a pesar de que no se determinaron los valores de superficie específica (SE), las imágenes obtenidas por SEM (**Figura 21**) muestran un aspecto similar de todos los hidrochars de SCG. No se evidencia variación en la porosidad, lo cual concuerda con lo reportado por Vardon et al. (2013). Los autores no encontraron diferencias significativas en el aumento de la SE después del desgrasado de los SCG, ni después de la conversión de este residuo pretratado en biochar.

Tabla 16. Perfil lipídico de los SCG y de los hidrochars obtenidos a 160 °C a partir de SCG previamente tratados, expresado en % de ácido graso (AG) como media $\pm$ SD ($n=3$).

	SCG	Control	D	L	D-L	L-D
Ácido Mirístico (C14)	0.09 $\pm$ 0.08	0.03 $\pm$ 0.05	n.d	n.d	0.11 $\pm$ 0.03	n.d
Ácido Palmítico (C16)	43.34 $\pm$ 1.86	42.40 $\pm$ 1.08	41.16 $\pm$ 1.50	43.57 $\pm$ 2.47	41.93 $\pm$ 1.68	45.44 $\pm$ 0.89
Ácido Estearico (C18)	8.98 $\pm$ 0.36 ^{b,c}	8.61 $\pm$ 0.26 ^{a,b}	8.04 $\pm$ 0.23 ^d	9.90 $\pm$ 0.13 ^a	8.69 $\pm$ 0.26 ^b	9.38 $\pm$ 0.21 ^{c,d}
Ácido Oleico (Z C18:1n9)	9.89 $\pm$ 0.17	9.92 $\pm$ 0.12	10.41 $\pm$ 0.10	10.04 $\pm$ 0.74	10.26 $\pm$ 0.16	10.16 $\pm$ 0.13
Acido Linoleico (Z C18:2n6)	32.37 $\pm$ 2.04 ^{a,b}	33.55 $\pm$ 0.83 ^{a,b}	35.96 $\pm$ 1.65 ^a	30.47 $\pm$ 1.85 ^b	33.57 $\pm$ 0.44 ^{a,b}	30.27 $\pm$ 0.94 ^a
Ácido Linolénico (C18:3n3)	0.39 $\pm$ 0.09 ^b	0.41 $\pm$ 0.03 ^b	0.38 $\pm$ 0.05 ^a	n.d ^b	0.24 $\pm$ 0.21 ^{a,b}	n.d ^a
Ácido Araquidónico (C20)	3.93 $\pm$ 0.02 ^a	4.03 $\pm$ 0.47 ^a	3.54 $\pm$ 0.03 ^b	4.84 $\pm$ 0.12 ^a	4.08 $\pm$ 0.18 ^a	4.10 $\pm$ 0.14 ^a
Ácido cis 11-eicosenoico (C20:1)	n.d	0.10 $\pm$ 0.17	n.d	n.d	0.18 $\pm$ 0.16	n.d
Ácido Behénico (C22)	0.68 $\pm$ 0.03 ^{a,b}	0.69 $\pm$ 0.12 ^{a,b}	0.42 $\pm$ 0.06 ^b	0.81 $\pm$ 0.02 ^a	0.61 $\pm$ 0.15 ^{a,b}	0.52 $\pm$ 0.10 ^a
Ácido Lignocérico (C24)	0.32 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.11	0.09 $\pm$ 0.13	0.36 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.16	0.14 $\pm$ 0.12
Ácido C18:1n7 (W7)	n.d	n.d	n.d	n.d	0.15 $\pm$ 0.13	n.d
AGS	57.34 $\pm$ 2.26 ^{a,b}	56.02 $\pm$ 0.94 ^{a,b}	53.25 $\pm$ 1.51 ^a	59.49 $\pm$ 2.57 ^b	55.60 $\pm$ 1.05 ^{a,b}	59.57 $\pm$ 1.06 ^b
AGM	9.89 $\pm$ 0.17	10.02 $\pm$ 0.23	10.41 $\pm$ 0.10	10.04 $\pm$ 0.74	10.60 $\pm$ 0.41	10.16 $\pm$ 0.13
AGP	32.77 $\pm$ 2.10 ^{a,b}	33.96 $\pm$ 0.84 ^{a,b}	36.34 $\pm$ 1.61 ^b	30.47 $\pm$ 1.85 ^a	33.80 $\pm$ 0.64 ^{a,b}	30.27 $\pm$ 0.94 ^a

Nomenclatura de los residuos: D: desgrasado; L: lavado con etanol; D-L: desgrasado y lavado con etanol; L-D: lavado con etanol y desgrasado.

n.d: no detectado. AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados. Diferentes letras en la misma línea indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

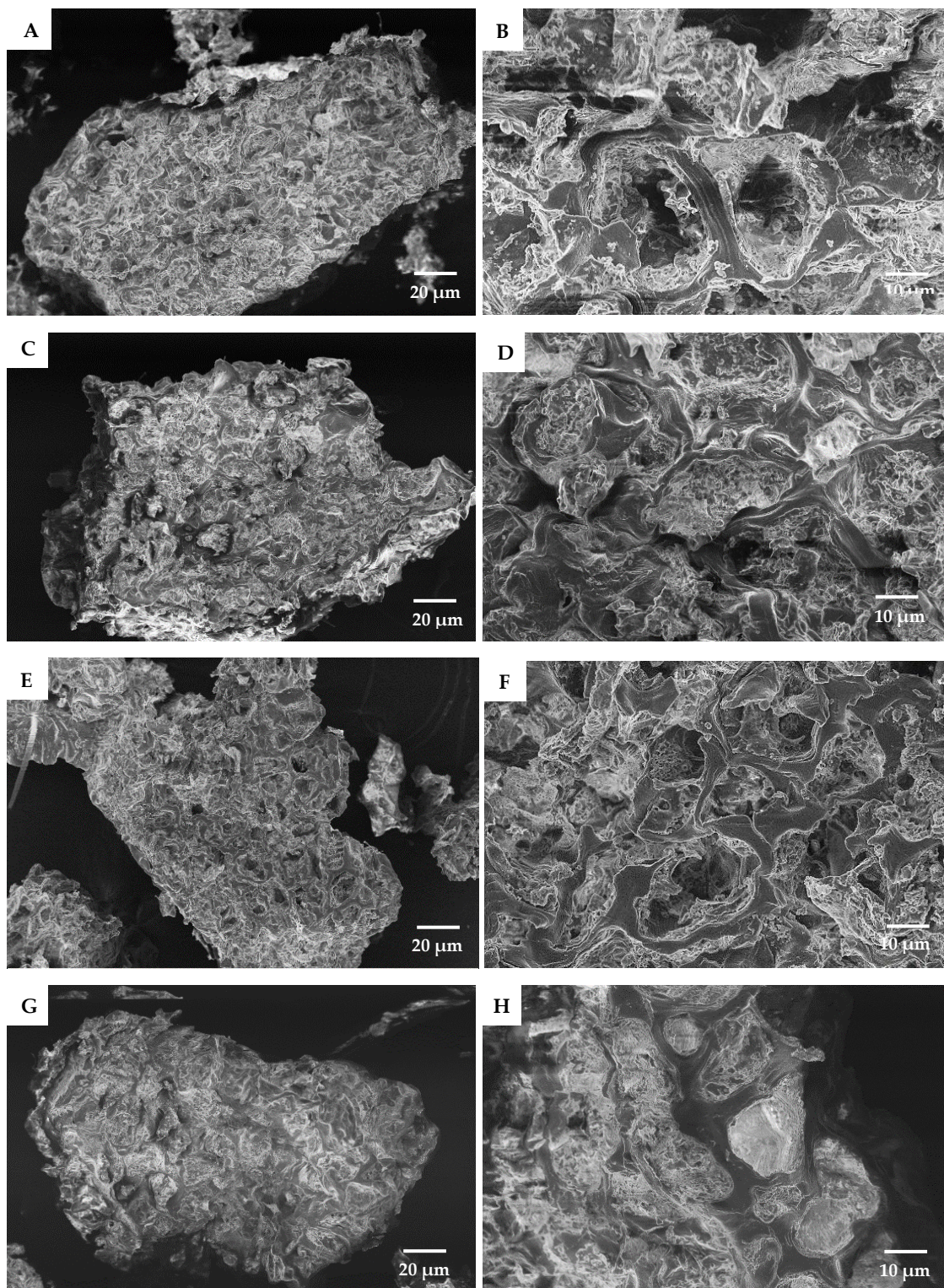


Figura 21. Imágenes SEM de los hidrochars obtenidos a 160 °C a partir de SCG tratados previamente. Dos imágenes por caso, la primera corresponde a la partícula entera y la segunda al detalle de su superficie. En parejas: A) y B) hidrochar desgrasado (residuo D); C) y D) hidrochar lavado (residuo L); E) y F) hidrochar desgrasado y lavado (residuo D-L); G) y H) hidrochar lavado y desgrasado (L-D).

Finalmente, al comparar con el control (**Figura 13B**), se puede observar que la aplicación de uno o dos de estos pretratamientos parece no solo afectar la definición de las partículas, sino que tiende a producir hidrochars con mayor cantidad de materia residual en los poros. Ante esto, Vardon et al. (2013) sugieren la aplicación de un tratamiento de activación posterior a la carbonización.

Consideraciones finales

Entre las dos técnicas de detoxificación estudiadas en esta sección, el desgrasado produjo más cambios significativos en el hidrochar, sin embargo, estos cambios no tienen relevancia para su uso en el suelo. Ninguno de los tratamientos o combinaciones aplicadas mejoró las características morfológicas o redujo significativamente la toxicidad de los hidrochars.

Por tal motivo, se concluye que la aplicación de uno o ambos métodos de detoxificación de los SCG estaría sujeta exclusivamente al aprovechamiento que se le quiera dar a los productos secundarios generados (polifenoles totales y ácidos grasos) mas no a los beneficios que pueda traer a los hidrochars directamente. En ese caso, se haría necesario un estudio de optimización de la técnica u/o parámetros para la obtención de los compuestos de interés con el mejor rendimiento posible. El acoplamiento con otros beneficios indirectos, como es el aumento del contenido de azúcares en los licores de HTC, también podría tomarse en cuenta para un diseño de bio-refinería.

4.4. Activación química de los hidrochars de posos de café para la mejora de su funcionalidad como bio-quelatos agrícolas.

Preámbulo

El contenido de polifenoles y melanoidinas de los SCG ha conducido a un primer estudio del uso de este residuo como bio-quelato agrícola para biofortificación de plantas comestibles (Cervera-Mata, et al., 2021a), debido a la denominada “capacidad quelante” atribuida a estos compuestos (Takenaka, et al., 2005; Rufián-Henares & De La Cueva, 2009). El mayor contenido de polifenoles totales evidenciado en los hidrochars de SCG obtenidos en este trabajo (**Tabla 14**) puede suponer un mayor potencial de estos bio-productos para adsorber compuestos minerales que los propios SCG.

Además, los materiales carbonosos derivados de distintas fuentes rara vez son utilizados tal cual después de la conversión de la biomasa, sino que en la bibliografía se proponen diversos postratamientos para la obtención de carbones activados (ACs) (Adan-Mas, et al., 2021). Los procesos de activación tienen por objetivo añadir más funcionalidad a las superficies de las partículas gracias a la modificación o mejora de su reactividad química (Yokota, et al., 2022) a través de, por ejemplo, la mejora de la porosidad y el área superficial. Concretamente, la activación con NaOH ya ha sido utilizada para la activación de SCG (Han Chiu & Yin Lin, 2019) y otros residuos (Hu, et al., 2021; Yokota, et al., 2022). Otros activadores aplicados a los SCG incluyen: KOH (Adan-Mas, et al., 2021), ZnCl₂ (Rufford, et al., 2008) y CO₂ (Charmas, et al., 2022).

Por lo tanto, en este nuevo estudio (Ensayo 4) se pretende evaluar el efecto que tiene la activación química con NaOH sobre los hidrochars de SCG en la mejora de la adsorción de Zn y de Fe tras su funcionalización y de esta manera potencializar su uso como bio-quelatos agrícolas.

4.4.1. Modificaciones de los bio-productos con la activación

Para la elucidación rápida de la distribución global de carbonos entre los principales grupos orgánicos presentes en las matrices de los bio-productos se realizó una ¹³C-

CPMAS-NMR en estado sólido. Los valores integrados de cada dominio de carbono se muestran en la **Tabla 17**. En la región de carbono alifático (0-47 ppm) se destacan cuatro picos (**Figura 22**). El primer pico, a ~11 ppm indica la presencia de C alifáticos de cadena corta. El pico pequeño a ~21 ppm está frecuentemente asociado en la literatura a grupos acetato de la hemicelulosa (Piterina, et al., 2009). Este pico desaparece con la activación. Los mayores cambios en esta región se aprecian en la intensificación de los dos últimos picos a ~26 y 30 ppm cuando los bio-productos son activados. Fuertes et al. (2010) atribuyen estos carbonos a constituyentes de polímeros lipídicos.

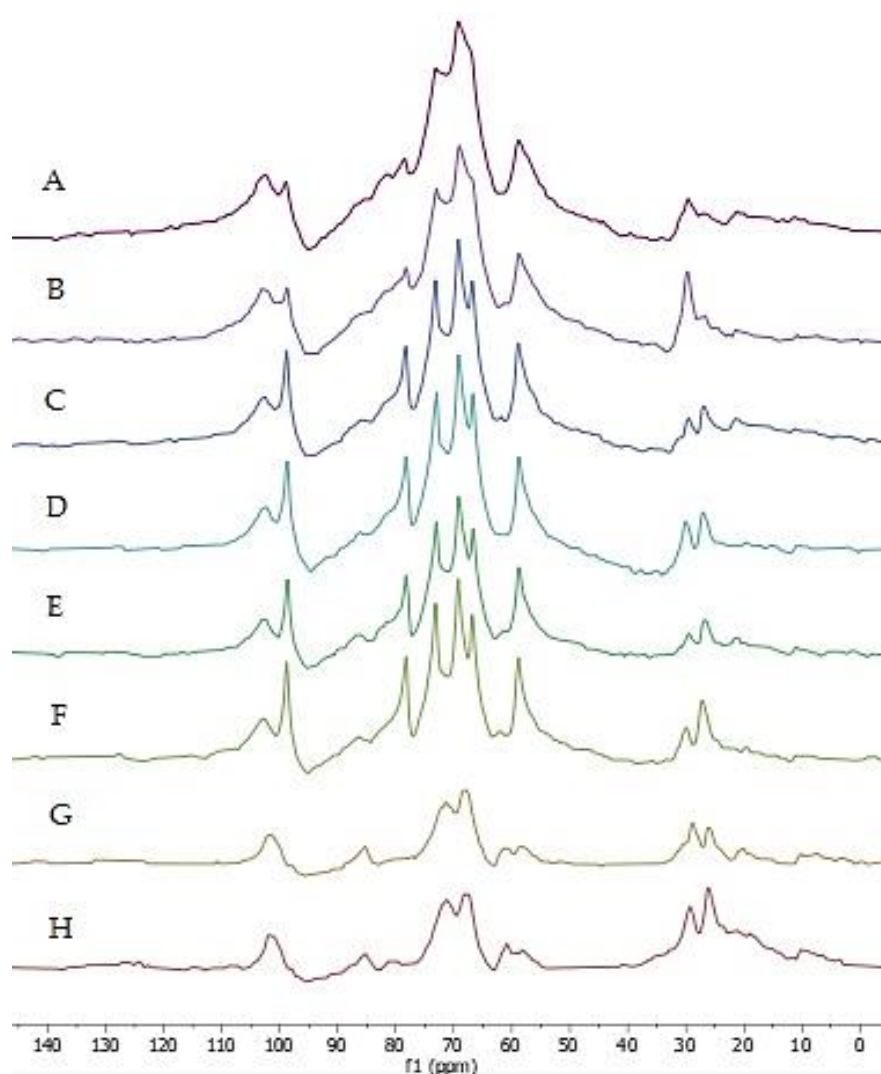


Figura 22. Espectros de ^{13}C -CPMAS-NMR en estado sólido de los SCG, sus hidrochars antes y después de la activación con NaOH. A) SCG, B) ASCG, C) H160, D) AH160, E) H180, F) AH180, G) H200, H) AH200.

La región de C alquilo-N y O (47-113 ppm) es la más abundante en todos los bio-productos, entre el 53 y 91%. Esta región se asocia principalmente con el C alquilo sustituido con O en los carbohidratos, pero también incluye C de metoxilo y C alquilo sustituido con N en las proteínas (Piterina, et al., 2009). La **Figura 22** muestra siete señales prominentes en esta región. Los picos a ~59, 66, 70, 73 y 78 ppm corresponden a grupos de C alquilo-O de los átomos de C-2, C-3 y C-5 de la celulosa y hemicelulosa, los cuales son menos prominentes en H200 y AH200. Los picos observados a ~100 y 103 ppm representan los C anoméricos (C-1) de la celulosa (Fernandez-Bayo, et al., 2018) que destacan más en los productos obtenidos a temperaturas de HTC de 160 °C (H160, AH160) y 180 °C (H180, AH180). Estos resultados confirman que la celulosa y hemicelulosa tienen dominancia en todos los bio-productos, pero estas formas de carbono disminuyen conforme se transforman con la degradación provocada por la HTC, más que por la activación (**Tabla 17**). Esta disminución, según Fuertes et al. (2010) sugiere una mayor estabilidad a largo plazo de los carbones aplicados en el suelo. Los valores más altos de A/AO respecto a HB/HI (**Tabla 18**) corroboran la presencia mayoritaria de estructuras hidrofílicas constituyentes de estos polisacáridos (Fregolente, et al., 2021).

Tabla 17. Valores de integración para los principales dominios orgánicos de tipo C en los espectros de ¹³C-CPMAS-NMR de los hidrochars sin y con activación.

Bio-producto	Regiones de cambio químico (ppm)				
	160-210	113-160	47-113	27-47	0-27
Distribución del carbono (%)					
SCG	2.07	0.05	87.29	5.61	4.98
ASCG	1.52	0.05	84.25	9.10	5.08
H160	0.94	0.00	77.75	7.54	13.76
AH160	0.08	0.03	83.00	6.15	10.75
H180	0.06	0.50	91.47	4.42	3.54
AH180	0.00	0.19	79.40	7.43	12.98
H200	0.00	0.01	70.95	9.97	17.80
AH200	0.00	2.21	53.76	12.36	31.67

Valores mostrados como % del valor de integración del C total.

Tanto la región aromática (113-160 ppm) como la región carboxílica (160-210 ppm) representan un porcentaje muy bajo o nulo de la composición de los bio-productos (**Tabla 17**). Se observa que conforme se aplican los procesos de carbonización hidrotermal y activación estos grupos funcionales desaparecen totalmente. Esto puede deberse a la propia composición de la materia prima o, posteriormente, a los procesos de descarboxilación (Fregolente, et al., 2021). La ausencia de picos en los espectros (**Figura 22**), así como los bajos índices de aromaticidad que exhiben todos los bio-productos (ARM, **Tabla 18**) se alinean con lo encontrado. Sin embargo, el contenido de polifenoles totales ya conocido en los bio-productos (**Tabla 14**, Tabla 20) no parece ser detectado por esta técnica. Paradowska et al. (2017) tampoco encontraron señales visibles correspondientes a compuestos fenólicos en espectros de polen (PT: 4.4 - 29.1 mg/g). Los autores atribuyen su baja detección a: 1) la insuficiente sensibilidad establecida para el análisis con RMN y, 2) la baja concentración de PT comparada con los azúcares. En el caso de los subproductos de SCG, la baja detección podría ser debido a la dominante composición de polisacáridos de celulosa y hemicelulosa, que se ha comentado antes.

Tabla 18. Índices estructurales de los bio-productos activados y no activados.

Bio-producto	HB/HI	A/AO	ARM	LR
SCG	0.1	0.2	0.001	0.1
ASCG	0.2	0.3	0.001	0.2
H160	0.2	0.2	0.000	0.3
AH160	0.2	0.1	0.000	0.2
H180	0.1	0.3	0.005	0.1
AH180	0.2	0.4	0.002	0.3
H200	0.3	0.8	0.000	0.4
AH200	0.7	0.8	0.023	0.8

Valores obtenidos a partir de las ecuaciones (3), (4), (5) y (6).

En general, los índices estructurales obtenidos para los SCG y los subproductos derivados son muy bajos comparados con los obtenidos, por ejemplo, por Fregolente et

al. (2021) para hidrochars obtenidos a 230 °C a partir de bagazos de caña de azúcar y que los autores concluyen, posee características similares a la turba. La comparación conjunta de los ratios de la **Tabla 18** no muestra un cambio importante de la hidrofobicidad, aromaticidad, contenido de lignina y carbono alquilo en las partículas a causa de la activación.

En relación con las propiedades físicas de las partículas, los resultados de superficie específica (SE) se recogen en la **Tabla 19**. El valor obtenido para SCG concuerda con lo reportado en la bibliografía (Vardon, et al., 2013). Según Ballesteros et al. (2014), este residuo presenta una baja SE debido a que los mesoporos no tienen un buen desarrollo, carece de microporos y tiene bajo volumen de poros (0.004 cm³/g). Al aplicar una HTC a los SCG, se observa que este valor aumenta hasta 27 veces su valor inicial cuando la temperatura del proceso alcanza los 180 °C, pero empieza a disminuir a temperaturas más altas. Por otro lado, contrario a lo esperado, después de la activación también se observa una disminución de este parámetro, excepto en el caso de H200 que aumenta un 50%. Estos cambios y la marcada tendencia a la reducción de este parámetro pueden estar relacionados con los procesos aplicados a los bio-productos. Tanto la HTC como la activación química funcionan como un proceso de degradación. Además, ambos procesos se llevan a cabo en un circuito cerrado y en medio acuoso, lo que provoca que el material de degradación se deposite y adhiera a las partículas dando como resultado carbones activados con poros obstruidos y por ende con menor superficie de contacto (SE). El uso de otra técnica de análisis de SE podría corroborar los valores encontrados en este trabajo.

Independientemente de la variación de superficie específica encontrada, los valores obtenidos tanto antes como después de la activación son muy bajos comparados con otros carbones, incluso con los obtenidos a partir de SCG: 669 m²/g activado también con NaOH (Han Chiu & Yin Lin, 2019), 1019 m²/g activado con ZnCl₂ seguido de un lavado (Rufford, et al., 2008), 728 m²/g activado con H₃PO₄ (Charmas, et al., 2022). En este último caso, los autores también aplicaron un proceso de lavado, pero con agua caliente, el cual provocó un aumento intensivo de la superficie y el volumen de los poros. (Charmas, et al., 2022). Las altas temperaturas aplicadas en dichos procesos de carbonización (> 450°C), el tipo de técnica utilizada (pirólisis), así como la aplicación de un lavado

posterior para la remoción de material de degradación residual podría justificar las diferencias con los valores de SE obtenidos para los hidrochars de SCG en este trabajo.

Tabla 19. Superficie específica BET de los bio-productos antes y después de la activación química.

Bio-producto	Superficie específica (m ² /g)	
	No Activado	Activado
SCG	0.62 ± 0.01	0.40 ± 0.00
H160	9.15 ± 0.08	6.59 ± 0.04
H180	17.15 ± 0.04	7.74 ± 0.02
H200	14.65 ± 0.05	22.00 ± 0.05

Valores expresados como media ± SD (n= 3).

Las imágenes obtenidas mediante SEM de los bio-productos activados y no activados (**Figura 23**) pueden, en algunos casos, alinearse con los resultados de superficie específica de la **Tabla 19**. La activación cambia la morfología de los SCG, tal como se muestra en las **Figura 23A y B**, hacia partículas más definidas, pero con muchos poros en formación que aún se encuentran cerrados. En el caso de H160 y H180 (**Figura 23C, D, E y F**) la activación no parece tener un cambio relevante en la morfología. Las partículas exhiben una porosidad similar antes y después de la activación, con material de relleno que, en mayor o menor grado, puede afectar la superficie específica y justificar su reducción después de la activación, sobre todo en AH180 (**Figura 23F**). Contrario al resto de hidrochars, H200 parece sufrir una ruptura de toda su estructura con la activación. Se observa un campo óptico con partículas de menor tamaño, superficie no definida y con mucho material de degradación, similar a los SCG iniciales (**Figura 23H**). Estas observaciones no concuerdan con el aumento de SE encontrada para este bio-producto, la más alta de todos (22 m²/g, **Tabla 19**).

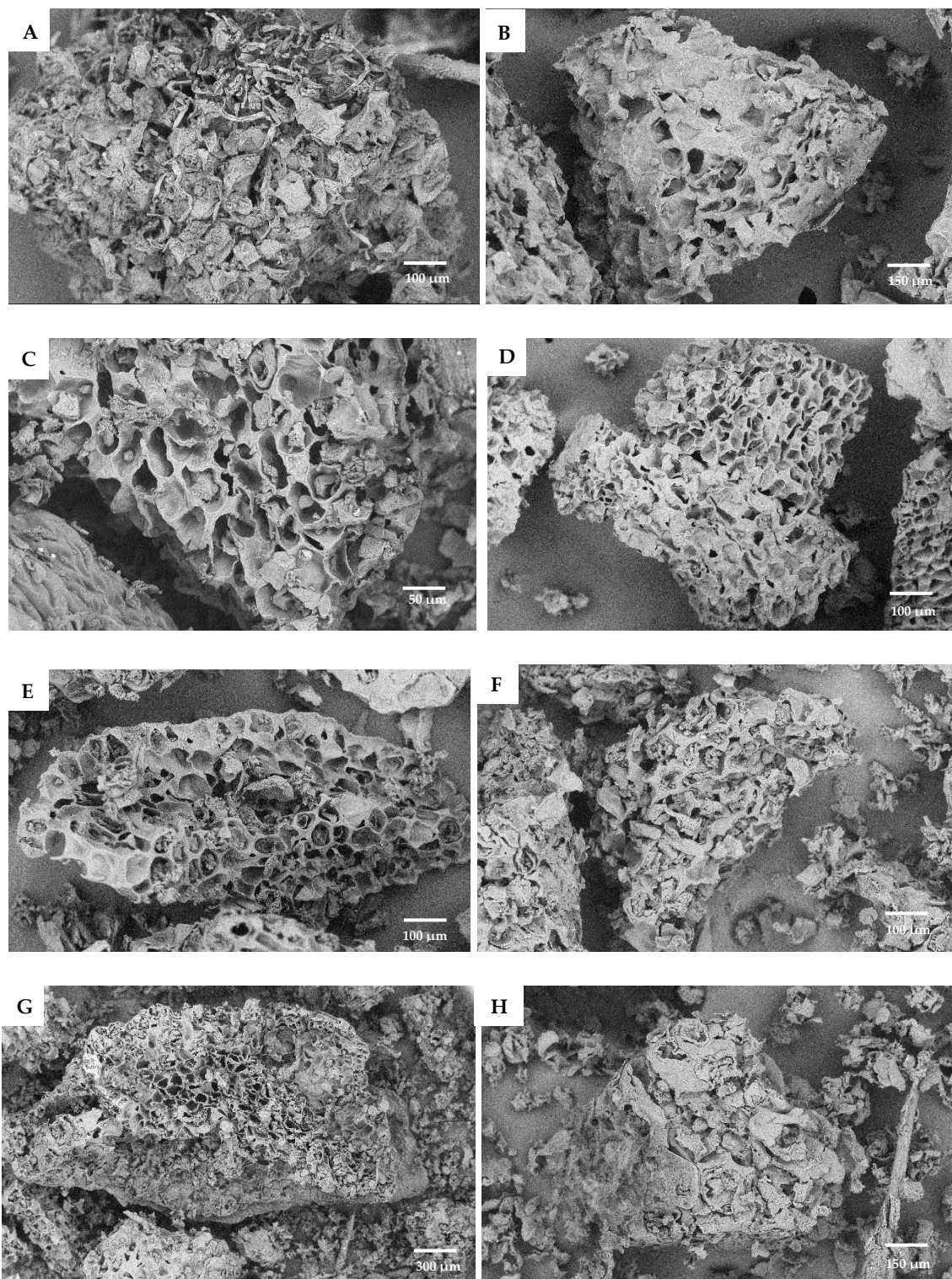


Figura 23. Imágenes SEM de los bio-productos antes y después de la activación química con NaOH. A) SCG, B) SCG activado, C) H160, D) AH160, E) H180, F) AH180, G) H200, H) AH200.

El rendimiento de la activación con NaOH obtenido en este trabajo para los SCG y sus hidrochars se muestra en la **Figura 24**. Al igual que lo observado en el caso de la HTC (**Figura 15**), el rendimiento de la activación varía de manera inversa con la temperatura de obtención del hidrochar, por tanto, el mayor rendimiento se obtiene con H160 (62%) y el menor con H200 (46%). Existe una reducción del 7.8% cada vez que la temperatura aumenta 20 °C.

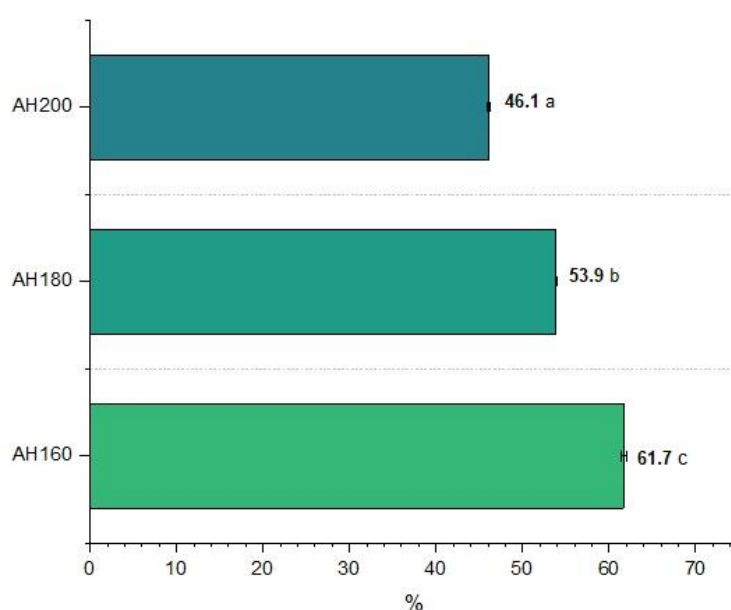


Figura 24. Rendimiento de la activación química de los hidrochars obtenidos a diferentes temperaturas de HTC.

Los bio-productos activados poseen propiedades fisicoquímicas diferentes a los no activados caracterizados anteriormente (**Tabla 14**). La activación genera productos con pH neutro y CE_{25} ligeramente más elevada (**Tabla 20**), esto debido a la neutralización con HCl después del tratamiento con NaOH, lo que genera un aumento de la salinidad. Las diferencias del contenido de sales entre los bio-productos pueden estar sujetas a efectos operacionales, sin embargo, no representan un peligro para su aplicación en el suelo debido a las pequeñas cantidades que se prevé emplear.

Respecto a la cantidad de polifenoles totales, existe una reducción importante en comparación con el contenido inicial de los SCG y los hidrochars (**Tabla 14**). Los bio-productos activados tienen un contenido que oscila entre 3.5 y 9.3 mg GAD/g, siendo ASCG el de menor contenido y AH200 el de mayor contenido (**Tabla 20**). Esta tendencia concuerda con el contenido de PT de los bio-productos antes de la activación (**Tabla 14**). La remoción de los compuestos fenólicos alcanza un 73.5% (AH180), lo que puede indicar su idoneidad también como un proceso de detoxificación.

Tabla 20. Características fisicoquímicas y contenido de polifenoles totales de los bio-productos activados.

Bio-producto	pH	CE ₂₅ (dS/m)	PT (mg GAD/g)	-ΔPT* (%)
ASCG	7.4 ± 0.1	2.01 ± 0.1	3.5 ± 0.7	46.3
AH160	7.9 ± 0.1	1.6 ± 0.1	4.9 ± 1.1	52.2
AH180	7.8 ± 0.0	1.3 ± 0.0	5.1 ± 0.2	73.5
AH200	7.4 ± 0.1	0.9 ± 0.0	9.3 ± 0.6	71.2

Valores expresados como media ± SD (n= 3).

*porcentaje de disminución calculado a partir del contenido previo a la activación registrado en la **Tabla 14**.

El “lavado” de polifenoles puede ser parte del efecto de solubilización de compuestos orgánicos que produce el tratamiento con NaOH (Wilson & Novak, 2009). Estos mismos autores indican que, además de PT, en el proceso también se extraen melanoidinas generadas por la condensación de azúcares reductores con los aminoácidos. El residuo líquido coloreado generado en este proceso de activación respalda esta afirmación. Este hecho nos lleva a hipotetizar que el contenido de melanoidinas tanto en los SCG como en los hidrochars activados también se ha reducido y probablemente en la misma proporción que los PT. La eliminación de los PT es un aspecto relevante respecto a la fitotoxicidad de estos bio-productos señalada por algunos autores (Hardgrove & Livesley, 2016; Cervera-Mata, et al., 2017, 2020, 2021b) y, que por lo tanto podría ampliar las opciones de uso en el campo agrícola.

4.4.2. Funcionalización de los bio-productos para la generación de bio-quelatos

Esta sección está dedicada específicamente al análisis de los cambios en el contenido de los minerales ensayados (Zn y Fe) en los bio-productos con la funcionalización y la activación.

La

Tabla 21 muestra que el contenido inicial de Zn y de Fe de los SCG y los hidrochars varía después de la activación química. Este contenido inicial de los bio-productos (SnAc) así como la variación provocada por la activación química (Ac) no es relevante para los objetivos de biofortificación planteados más adelante; sin embargo, cuando los SCG y los hidrochars son funcionalizados con sales de Zn y Fe (

Tabla 21) el contenido mineral aumenta considerablemente. Este efecto se magnifica con la aplicación del proceso de activación con NaOH previo a la funcionalización (Ac-Fnc). Se observa también una ligera ventaja de adsorción mineral en los hidrochars en comparación con los SCG.

La capacidad de retención de elementos minerales de los SCG ha sido atribuida casi exclusivamente a la presencia de polifenoles y melanoidinas, y calificada como capacidad quelante (Takenaka, et al., 2005; Rufián-Henares & De La Cueva, 2009). No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo no se alinean con esta afirmación. Primero, partiendo del hecho de que, a pesar de que el hidrochar obtenido a 200 °C posee la mayor cantidad de polifenoles totales (**Tabla 14**), es el bio-producto menos eficiente en la funcionalización (

Tabla 21). Segundo, existe un aumento considerable del contenido mineral en todos los bio-productos que fueron activados previo a la funcionalización (

Tabla 21), a pesar de que estos perdieron hasta casi el 80% de sus compuestos fenólicos debido al tratamiento con NaOH (**Tabla 20**). Estos resultados no nos permiten afirmar que los polifenoles impiden la retención de elementos, sino que la capacidad quelante de las partículas de SCG y sus hidrochars no recae específicamente en la presencia o abundancia de estos compuestos. Esta declaración tampoco invalida en nada el efecto quelante que se ha demostrado que tienen tanto las melanoidinas (Cervera-Mata, et al., 2021a) como los polifenoles (Cianciosi, et al., 2022) por sí mismos.

En este trabajo, los bio-productos parecen tener mayor afinidad al Fe que al Zn tras la funcionalización (SnAc-Fnc,

Tabla 21), contrario a lo encontrado por Cervera-Mata et al. (2021a) que obtuvieron bio-quelatos de SCG con mayor contenido de Zn que de Fe (SCG-Zn: 17924 mg/kg; SCG-Fe: 4025 mg/kg). Pese a que el método de funcionalización utilizado en ambos trabajos fue el mismo, esta diferencia se puede atribuir a variaciones por efectos de operación o incluso al estado y origen del residuo.

Cuando los bio-productos son activados antes de la funcionalización la afinidad hacia el Zn parece mejorar (Ac-Fnc,

Tabla 21) puesto que existen incrementos mayores de este (126-758%) en comparación con el Fe (81-230%) después de la funcionalización. No obstante, el aumento de esta afinidad no termina por superar el contenido final de Fe de los bio-quelatos, siendo que el bio-producto con mayor contenido de Zn (SCG-Zn: 7411.08 mg/kg) solo es comparable con el bio-producto con menor contenido de Fe (H200-Fe: 7410.40 mg/kg).

Por último, estos resultados indican que la activación si es un procedimiento efectivo para aumentar la capacidad de retención de minerales de las partículas de SCG y sus hidrochars a pesar de que no existe una mejora de las propiedades físicas (superficie específica, índices estructurales, etc) como sugieren Adan-Mas et al. (2021). Hu et al. (2012) atribuyen la mejora de la adsorción de minerales tras la activación con NaOH al efecto de intercambio iónico, atracción electrostática y complejación. Un estudio de estos mecanismos debería llevarse a cabo para entender el aumento de la capacidad de adsorción en estos bio-productos activados.

Tabla 21. Contenido de Zn y Fe de los bio-productos en ausencia y/o presencia de activación y una posterior funcionalización.

Bio-producto	Zn (mg/kg)				Fe (mg/kg)			
	SnAc	Ac	SnAc-Fnc	Ac-Fnc	SnAc	Ac	SnAc-Fnc	Ac-Fnc
SCG	10.16 ± 0.44	5.42 ± 0.38	3282.47 ± 35.25	7411.08 ± 263.09	102.82 ± 12.71	67.77 ± 5.86	8084.74 ± 109.27	15368.44 ± 250.69
H160	9.11 ± 1.42	5.83 ± 0.34	859.60 ± 29.90	7376.49 ± 184.70	97.81 ± 2.54	110.52 ± 7.96	4298.30 ± 273.26	14206.73 ± 211.49
H180	10.85 ± 0.69	4.38 ± 0.19	784.31 ± 32.91	5033.30 ± 139.10	113.32 ± 4.52	82.41 ± 4.43	4647.54 ± 112.52	10774.68 ± 224.71
H200	11.65 ± 2.41	6.62 ± 0.57	1296.22 ± 4.99	3588.44 ± 354.83	137.8 ± 10.47	100.38 ± 1.99	4097.80 ± 53.94	7410.40 ± 292.47

SnAc, sin activación; AC, activado; SnAc-Fnc, funcionalizado sin previa activación; Ac-Fnc, funcionalizado con previa activación. Valores expresados como media ± SD (n= 3).

Consideraciones finales

La activación química de los SCG y sus hidrochars no provocó cambios importantes en las propiedades estructurales o morfológicas de las partículas; sin embargo, la aplicación de este proceso previo a la funcionalización cumple con el objetivo principal planteado para este estudio. El tratamiento con NaOH no solo mejora la adsorción de elementos minerales en las partículas, hasta un 758% en el caso del Zn y hasta un 231% en el caso del Fe, sino que logra reducir en grandes proporciones (46-73%) el contenido de polifenoles totales, actuando al mismo tiempo como un proceso de detoxificación de estos bio-productos. La sencilla implementación como parte de un proceso de refinería para la obtención de bio-quelatos agrícolas, hace de este proceso de activación una alternativa efectiva, amigable con el medio ambiente y de bajo costo (Yokota, et al., 2022) para la revalorización de los SCG. Además, el residuo líquido generado de este tratamiento podría ser estudiado como fuente para la extracción de melanoidinas.

Se concluye además que la eficiencia de adsorción de Zn y de Fe de los SCG y sus hidrochars no tiene dependencia en los llamados “compuestos quelantes” que contienen ni en el grado de porosidad de las partículas, sino que posiblemente otro tipo de interacciones puedan estar influyendo sobre este mecanismo, el mismo que se ve mejorado con la activación. Un estudio más profundo de estas interacciones debería ser objeto de futuras investigaciones.

BLOQUE 2

En base al conocimiento adquirido en el bloque anterior sobre las características de los hidrochars de SCG, en esta sección se recogen las distintas aplicaciones exploradas para su uso en el campo agrícola.

4.5. Evaluación de la aplicación de los hidrochars de posos de café como enmienda orgánica de suelos agrícolas.

Preámbulo

Existe poca información acerca del uso de hidrochars como enmienda orgánica para mejorar el suelo. Hernández-Soto et al. (2019) propusieron el uso de hidrochar procedente de diferentes restos orgánicos domésticos como sustituto de la turba, comprobando su viabilidad mediante una prueba de germinación. Estos autores reportaron el efecto negativo de los hidrochars en la germinación de las plantas y establecieron que se debía a la presencia de compuestos fitotóxicos. Nuestro grupo de investigación estudió recientemente el efecto de diferentes transformaciones de SCG (vermicompost, compost, pirólisis, etc.) sobre su viabilidad como enmienda orgánica del suelo (Cervera-Mata et al., 2020). En este trabajo se incluyó en una fase piloto una muestra de hidrochar de SCG obtenido a 180 °C y se concluyó que estos subproductos eran tóxicos para el crecimiento de las plantas pero que tenían una aparente capacidad movilizadora de elementos nutrientes.

Con este antecedente, el objetivo de este ensayo es ampliar el conocimiento que existe sobre el uso de los hidrochars de SCG como enmienda orgánica de suelos empleando más dosis de ensayo y condiciones de temperatura de HTC diferentes pero cercanas a las de Cervera-Mata et al. (2020) (± 180 °C), dando así un paso más hacia la economía circular. Se estudiará también su posible uso en biofortificación agronómica como

potenciales movilizadores de elementos. El análisis de los resultados derivados del Ensayo 5 se expone a continuación.

4.5.1. Efectos sobre la fertilidad del suelo

La influencia de la adición de SCG e hidrochars en las propiedades del suelo se muestra en la **Tabla 22**. La adición de cualquiera de los bio-productos no modificó significativamente los valores de pH del suelo a pesar de su naturaleza ácida (**Tabla 12**), esto puede ser debido a la capacidad amortiguadora del suelo 2 (39% de carbonatos) (**Tabla 6**). La CE_{25} tampoco se vió modificada. Por otro lado, si se evidenciaron cambios significativos ($p < 0.05$) en los contenidos de CO, el cual aumentó en más del 1% proporcionalmente a las cantidades de bio-producto añadidas. El contenido máximo de CO se logró al agregar 2.5% de H185, debido a que este bio-producto tiene mayor contenido de C que H175 (**Tabla 12**). Este aspecto es fundamental en los suelos agrícolas españoles, pues en este territorio el 45% de los servicios ecosistémicos se han degradado o están siendo utilizados de forma insostenible (Santos-Martín, et al., 2019). Lo destacable de estos aumentos de CO no es tanto la cantidad sino la calidad de la materia orgánica añadida. En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Comino, et al., 2019), se estudió la influencia de la adición de SCG en la estabilidad de los compuestos orgánicos, encontrando que la mayoría de los compuestos de SCG tenían una naturaleza lábil. Según Cervera-Mata et al. (2022), los hidrochars de SCG tienen un mayor contenido de C recalcitrante que los SCG, lo que podría indicar que estos bio-productos serían más estables en el suelo, un aspecto muy destacable.

La adición de 2.5% de SCG e hidrochars aumentó significativamente ($p < 0.05$) la relación C/N del suelo. Del mismo modo, la adición de estos bio-productos aumentó los contenidos de N total y K disponible proporcionalmente a las cantidades añadidas, comprobando la capacidad fertilizante de ambos: SCG [ya informado por varios autores en los últimos años (Yamane, et al., 2014; Cervera-Mata, et al., 2017)] e hidrochars (primera vez que se documenta). Es importante resaltar cómo el hidrochar incrementó en menor medida el contenido de K disponible con respecto al SCG, debido al proceso de lavado a lo largo del proceso de HTC, como se indicó anteriormente (**Tabla 12**). En

cuanto al contenido de P, a pesar del aporte tanto por parte de los SCG como de los hidrochars, su adición provocó una disminución significativa ($p < 0.05$) del contenido de este macronutriente. Esto puede ser debido a la absorción del P disponible por las plantas, o a un bloqueo de P en el suelo, lo que se conoce como proceso de retrogresión (Navarro García & Navarro García, 2013).

Tabla 22. Efectos de los SCG y sus hidrochars obtenidos a diferentes temperaturas sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo después de 40 días de cultivo.

Tratamiento	pH	CE ₂₅ (dS/m)	CO (%)	N (%)	Total C/N	K (ppm)	asim. P (ppm)
Control	8.25	0.49	1.78 ^a	0.16 ^a	11 ^{a,b}	384 ^a	156 ^b
1% SCG	8.31	0.54	2.31 ^b	0.20 ^b	12 ^{a,b}	473 ^{c,d}	133 ^a
2.5% SCG	8.25	0.66	3.30 ^c	0.27 ^d	12 ^{a,b,c}	493 ^d	126 ^a
1% H175	8.28	0.75	2.41 ^b	0.21 ^b	11 ^{a,b}	442 ^b	138 ^{a,b}
2.5% H175	8.19	0.55	2.98 ^c	0.23 ^{b,c}	13 ^{b,c}	437 ^b	133 ^a
1% H185	8.25	0.53	2.44 ^b	0.22 ^{b,c}	11 ^a	451 ^{b,c}	132 ^a
2.5% H185	8.12	0.58	3.47 ^d	0.25 ^{c,d}	14 ^c	439 ^b	140 ^{a,b}

asim, asimilable. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

4.5.2. Efectos en planta

Sobre crecimiento y biomasa

Los SCG e hidrochars inhibieron el crecimiento de las lechugas (**Figura 25**. Imágenes de las lechugas cultivadas con las diferentes enmiendas y dosis ensayadas, tras un periodo de 40 días de cultivo.

. La inhibición que provocan los SCG por su carácter fitotóxico ha sido reportada previamente por nuestro grupo de investigación y otros autores (Cruz & dos Santos Cordovil, 2015; Hardgrove & Livesley, 2016; Cervera-Mata, et al., 2018, 2019, 2020).

Algunos investigadores informaron la tendencia opuesta cuando se agregaron SCG en dosis bajas (Cruz, et al., 2015). Dicho comportamiento podría estar relacionado con el tipo de suelo o medio de cultivo empleado (en el caso de estos investigadores, turba), ya que sus diferentes propiedades químicas, físicas y fisicoquímicas podrían afectar las características nutricionales de la planta (Ceglie, et al., 2015). Cervera-Mata et al. (2020) afirmaron que la presencia de compuestos fenólicos derivados de SCG fueron la causa de la inhibición del crecimiento. En este ensayo se ha corroborado esta teoría, demostrando que los hidrochars de SCG también tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las plantas a dosis bajas e intermedias (**Figura 25**) debido al aumento de polifenoles después del proceso HTC (**Tabla 12**).

Con respecto a la naturaleza de los polifenoles potencialmente tóxicos en los hidrochars, existe poca información en la literatura. Sin embargo, respecto a los SCG, Alves et al. (2017) añaden que, aparte del ácido clorogénico, hay muchos otros compuestos fenólicos como los ácidos ferulínicos, los ácidos p-cumaroilquínicos y los diésteres mixtos de ácido cafeico y ferúlico con ácido quínico. Reigosa et al. (1999) identificaron que el ácido ferúlico, el ácido p-cumaroilquínico y el p-hidroxibenzoico inhibían la germinación de seis tipos diferentes de plantas. Asimismo, Rasmussen & Einhellig (1977) también encontraron un efecto inhibitorio sinérgico del ácido p-cumaroilquínico y los ácidos ferúlicos en la germinación y crecimiento de las plantas. Por tanto, podemos plantear la hipótesis de que algunos de los tipos de polifenoles mencionados podrían ser los responsables de la fitotoxicidad también de los hidrochars, lo que debe ser objeto de más investigaciones.

Otros autores afirmaron que el hidrochar de estiércol porcino obtenido a 250 °C presenta fracciones de carbono lábiles (como carbohidratos y carboxilatos) que son fácilmente degradables (Cao, et al., 2011); esto podría dar lugar a una deficiencia de N relacionada con la inmovilización de N por parte de los microorganismos del suelo (Libra, et al., 2011). Este efecto también fue corroborado por la observación de Rillig et al. (2010), quienes encontraron que la adición de hidrochar de astillas de raíz de remolacha estimuló la colonización de la raíz por micorrizas y simultáneamente inhibió el crecimiento de la planta. Hernández-Soto et al. (2019) también corroboraron el efecto negativo sobre el crecimiento vegetal del hidrochar obtenido a 215 °C a partir de diferentes materias

primas, debido a la presencia de compuestos fitotóxicos. Afirmaron que un postratamiento por calentamiento a 275 °C bajo una atmósfera inerte de N elimina estas sustancias.

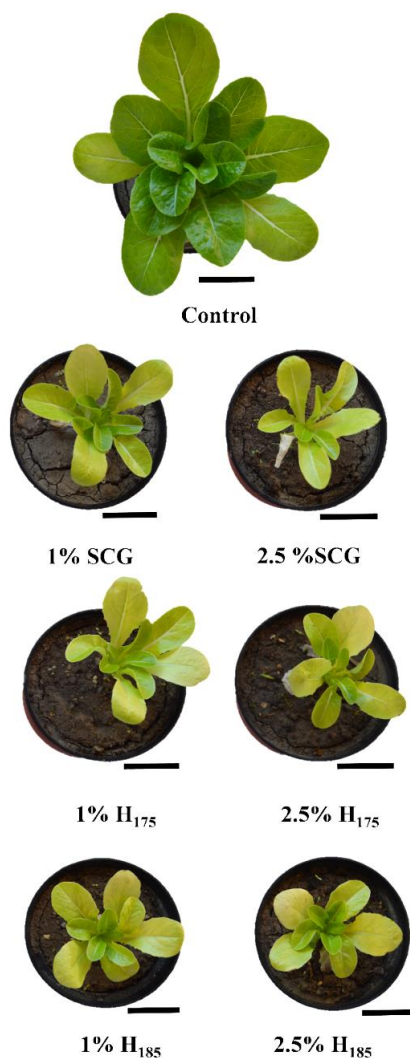


Figura 25. Imágenes de las lechugas cultivadas con las diferentes enmiendas y dosis ensayadas, tras un periodo de 40 días de cultivo.

Por el contrario, Baronti et al. (2017) afirmaron que la aplicación de hidrochar de ensilaje de maíz provocó un aumento de la biomasa vegetal uno o dos años después de la siembra. Este tiempo puede ser suficiente para eliminar los polifenoles provenientes del hidrochar. Sin embargo, establecer un período de dos años para mejorar el sistema suelo-

planta no es compatible con la agricultura convencional. Se deben evaluar otras alternativas para su aplicación.

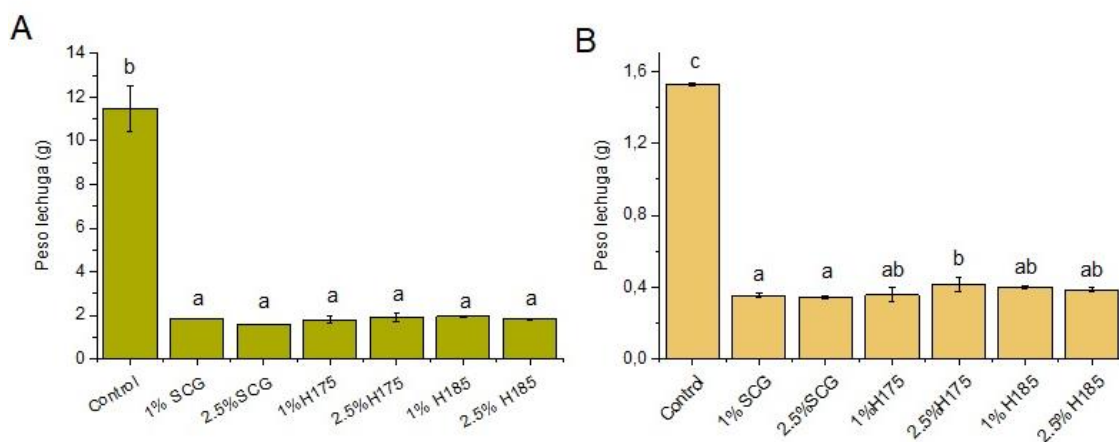


Figura 26. A) Peso fresco y B) peso seco de las lechugas después de un período de 40 días de cultivo. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Con respecto al peso seco de las lechugas (**Figura 26**), la adición tanto de SCG como de hidrochars disminuyó significativamente ($p < 0.05$) este parámetro fisiológico. Sin embargo, se puede observar que las lechugas cultivadas con hidrochar tuvieron un peso seco mayor que las cultivadas con SCG (aunque este hecho solo es estadísticamente significativo para las lechugas cultivadas con 2.5% H175), lo que podría indicar una tendencia a la acumulación de elementos minerales. Por lo tanto, si se eliminan esos compuestos que movilizan elementos, como los polifenoles, eliminaríamos la capacidad movilizadora de estos bio-productos (Cervera-Mata, et al., 2020). Consideramos que esta propiedad es una de las características más prometedoras del uso agronómico (como agentes biofortificantes) de los hidrochars, como se indica más adelante.

Sobre contenido de elementos minerales

El contenido de elementos minerales de las lechugas se muestra en la

Tabla 23. La adición de SCG e hidrochars aumentó las cantidades de los macroelementos Ca, Na y Mg. Los hidrochars incrementaron significativamente ($p < 0.05$) las cantidades de Ca en las lechugas con respecto a la muestra control: 21% para H175 (media de 1 y 2.5%) y 28% para H185 (media de 1 y 2.5%). Sin embargo, la adición de SCG no influyó significativamente en las cantidades de Ca en las plantas (Cervera-Mata, et al., 2019). El Mg tuvo un comportamiento similar al Ca: ambos hidrochars incrementaron este macroelemento en lechugas en mayor medida que los SCG. Estos resultados son opuestos a los encontrados por Cruz et al. (2014) luego de la adición de SCG fresco a turba, ya que este grupo observó una disminución de estos macroelementos también en lechugas. Estos autores lo atribuyen a que estos elementos se encuentran inmovilizados en la matriz del SCG y no llegan a ser biodisponibles para las plantas. Por otro lado, estos investigadores observaron que la adición de SCG compostado a la turba aumentaba las concentraciones de P, K y Na en las lechugas. Sin embargo, nuestro grupo de investigación (Cervera-Mata, et al., 2020) encontró resultados contrarios respecto al compostaje u otras transformaciones, ya que se observó cómo los SCG frescos aumentan la absorción y/o movilización de elementos en la planta, actuando como agentes biofortificantes. De hecho, cuando los SCG fueron transformados mediante compostaje y pirólisis, perdieron la mayoría de los compuestos fenólicos y la capacidad de movilizar elementos minerales, atribuyéndose esta capacidad biofortificante a los compuestos fenólicos. Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando los SCG se transforman en hidrochar, como indica el trabajo de Cervera-Mata et al. (2020).

Tabla 23. Efecto de los SCG y sus hidrochars a diferentes temperaturas sobre el contenido de macro y micronutrientes de las lechugas en un período de 40 días de cultivo.

Tratamiento	Macro y microelementos (mg/100g PF)							
	N	Ca	Na	K	Mg	Cu	Fe	Mn
Control	1000 ± 0 ^b	128 ± 7 ^a	4.82 ± 0.51 ^a	606 ± 10 ^c	18.12 ± 0.58 ^a	0.666 ± 0.010 ^a	0.737 ± 0.156 ^a	0.287 ± 0.023 ^a
1% SCG	500 ± 0 ^a	137 ± 4 ^{a,b}	12.51 ± 2.01 ^b	492 ± 5 ^a	21.44 ± 0.60 ^{a,b}	2.610 ± 0.421 ^b	0.820 ± 0.103 ^a	0.262 ± 0.035 ^a
2.5% SCG	470 ± 0 ^a	141 ± 1 ^{a,b}	7.97 ± 4.32 ^{a,b}	509 ± 8 ^{a,b}	23.08 ± 0.58 ^{b,c}	4.544 ± 0.236 ^c	0.664 ± 0.067 ^a	0.279 ± 0.041 ^a
1% H175	498 ± 0 ^a	153 ± 5 ^{b,c}	14.03 ± 4.43 ^{b,c}	550 ± 4 ^{a,b}	24.05 ± 0.19 ^{b,c}	3.128 ± 0.573 ^{b,c}	1.200 ± 0.573 ^{a,b}	0.287 ± 0.034 ^a
2.5% H175	453 ± 0 ^a	158 ± 14 ^c	18.74 ± 3.10 ^{c,d}	555 ± 25 ^{b,c}	24.93 ± 1.42 ^c	4.459 ± 0.365 ^c	0.899 ± 0.365 ^a	0.339 ± 0.070 ^{a,b}
1% H185	450 ± 0 ^a	159 ± 11 ^c	12.67 ± 3.01 ^{b,c}	539 ± 6 ^{a,b}	26.23 ± 0.42 ^c	3.250 ± 0.512 ^{b,c}	1.995 ± 0.421 ^c	0.302 ± 0.025 ^a
2.5% H185	470 ± 0 ^a	168 ± 1 ^c	23.76 ± 5.52 ^d	552 ± 9 ^{a,b,c}	25.75 ± 0.30 ^c	3.166 ± 0.492 ^{b,c}	1.729 ± 0.556 ^{b,c}	0.420 ± 0.013 ^b

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Valores expresados como media ± SD ($n = 3$) en una base de 100 g de peso fresco.

La pérdida de compuestos fenólicos por calentamiento depende del tipo de tratamiento aplicado: pirólisis o HTC. Así, Bargmann et al. (2014) encontraron que la pirólisis elimina los polifenoles ya que estos se pierden por volatilización. Sin embargo, la HTC no elimina estos compuestos ya que es un sistema cerrado. La adición de SCG e hidrochar disminuyó las cantidades de N y K en las lechugas (

Tabla 23). Tal disminución de N (aproximadamente 50%) está estrechamente relacionada con la disminución del peso fresco de las lechugas, lo que coincide con Cruz & Cordovil (2015) con el uso de SCG frescos. Estos autores atribuyeron este efecto a la inmovilización de N y P por los microorganismos del suelo debido a la alta C/N de los SCG frescos (22) o a la presencia de cafeína, que inhibiría la mineralización de N. La adición de SCG e hidrochars también disminuyó significativamente ($p < 0.05$) los contenidos de K a pesar del aumento de los niveles de K en el suelo cuando se agregaron estas enmiendas biológicas (**Tabla 22**). Este hecho podría explicarse por la sinergia entre ambos elementos (N y K): la disminución de un elemento en la planta provoca la disminución del otro (Rietra, et al., 2017). Además, el K es un elemento antagónico al Ca y al Mg, y el aumento en la absorción de estos últimos elementos disminuiría la absorción de K por parte de las plantas (Rietra, et al., 2017). En cuanto a los micronutrientes, ambos hidrochars incrementaron el contenido de Cu, Fe y Mn (

Tabla 23). Al igual que en el caso de los macroelementos, Cruz et al. (2014) encontraron resultados opuestos a los de este ensayo. Tal aumento en la capacidad de movilización de los SCG e hidrochars también podría atribuirse a los compuestos fenólicos presente en su composición química, que actuaría como quelante (Cervera-Mata, et al., 2020). Además de los compuestos fenólicos, la HTC de los SCG generó compuestos de color oscuro, atribuibles a la reacción de Maillard, posiblemente melanoidinas, que también han sido reportadas como agentes movilizadores de metales (Rufián-Henares & De La Cueva, 2009). Asimismo, la capacidad quelante de los SCG podría atribuirse a las proteínas, según lo establecido por Tokimoto et al. (2005). Por tanto, parece que la capacidad quelante de los SCG y los hidrochars se deriva de compuestos con grupos

funcionales capaces de complejar elementos minerales y actuar como movilizadores. De la misma manera, Libra et al. (2011) establecieron que la gran cantidad de grupos carboxilato en la superficie del hidrochar podría aumentar la capacidad de intercambio catiónico, mejorando el nivel de nutrientes quelados. Este mecanismo podría ser de particular importancia para la fabricación de quelatos comerciales a partir de estos subproductos, que podrían utilizarse en el campo de la biofortificación agronómica. Por otro lado, según Libra et al. (2011), los hidrochars podría retener más nutrientes en una forma disponible para las plantas.

Consideraciones finales

Todos los datos obtenidos permiten afirmar que el comportamiento de los hidrochars en el suelo es bastante similar a los SCG, aunque su potencial como movilizadores de elementos parece ser algo mayor. Esto último puede deberse a que los hidrochars poseen un contenido más alto de compuestos fenólicos y, posiblemente, de melanoidinas. Esta hipótesis hace que los hidrochars sean susceptibles de ser utilizados en pequeñas dosis (<1%) (por su marcado carácter fitotóxico) como elementos movilizadores.

Las propiedades fisicoquímicas del suelo no se vieron alteradas, pero cabe destacar el aporte de carbono orgánico a dosis altas (>2.5%), sobre todo de hidrochars obtenidos a temperaturas de HTC mayores a 185 °C, que podrían contribuir formas de C más recalcitrantes, importantes para la estabilidad del suelo. Esta puede ser otra opción de utilización de los hidrochars de SCG: la restauración de suelos pobres en materia orgánica. Aquí la solución es incorporar los bio-productos al suelo y dejar que se transformen durante mucho tiempo como lo describe Cruz et al. (2015) para los SGC. Se necesita más investigación para probar estas hipótesis.

4.6. Efectos de la adición de los hidrochars de posos de café funcionalizados con Zn y Fe (bio-quelatos) para la biofortificación agronómica de plantas comestibles

Preámbulo

En base a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, en este estudio se explora la capacidad movilizadora de elementos de los hidrochars de SCG para la biofortificación de plantas, concretamente en Zn y Fe. Esta capacidad ha sido demostrada anteriormente para los SCG por nuestro grupo de investigación (Cervera-Mata, et al., 2021a) y puesto que en el Ensayo 4 de esta tesis doctoral también se comprobó que los hidrochars pueden adsorber elementos minerales, se plantea la hipótesis de que estos bio-productos podrían usarse como bio-quelatos y como reserva de micronutrientes para las plantas cuando se aplican en cantidades no fitotóxicas.

Esta forma de utilizar los residuos este tipo de residuos como agentes para obtener plantas biofortificadas con micronutrientes representa un cambio de paradigma ya que tradicionalmente se han orientado a incrementar el carbono orgánico del suelo. Esta sección responde al análisis de los resultados encontrados en el Ensayo 6.

4.6.1. Efectos sobre el suelo

Se sabe que la adición de SCG e hidrochars al suelo como enmienda orgánica podrían influir en la fertilidad del suelo dependiendo de la dosis y tipo de bio-producto. Se midieron tres parámetros para evaluar los cambios producidos en el suelo después del cultivo: pH, CE₂₅ y el contenido de CO. La **Tabla 24** muestra variaciones muy leves entre los suelos con bio-productos versus los controles, excepto para H200-1 (ensayo Zn) y H200-Zn-1, que provocaron cambios más marcados en estas propiedades. Esto puede estar relacionado con la pequeña cantidad de bio-productos añadida a cada maceta (no más del 0.57%), en comparación con H200 y H200-Zn (3.01%) (**Tabla 10**) debido al bajo contenido de Zn después de la funcionalización (**Tabla 9**). La tendencia apunta a un aumento de CE₂₅ y CO y una disminución del pH de forma proporcional con la cantidad

de bio-producto agregado. Los resultados encontrados en esta investigación se correlacionan bien con los reportados para SCG (Cervera-Mata, et al., 2018) e hidrochars (ensayo anterior). Además, Cervera-Mata et al. (2018) observaron una posterior estabilización de estas propiedades vinculadas a: (1) el tipo de suelo ya que este puede tener capacidad amortiguadora debido a la alta presencia de carbonatos, y (2) el tiempo de incubación/cultivo que debe ser considerado en futuras investigaciones. Estas observaciones también están de acuerdo con otros estudios (Morikawa & Saigusa, 2008; Vela-Cano, et al., 2019).

Los hidrochars son productos altamente carbonosos por lo que su aplicación al suelo sugiere un impacto directo en el incremento del contenido de CO, lo cual concuerda con la tendencia encontrada en este estudio. Sin embargo, este efecto no fue significativo en la mayoría de los tratamientos debido a la pequeña cantidad de bio-producto agregado. Los cambios en el contenido de CO se reportaron como significativos ($p < 0.05$) cuando los hidrochars se agregaron al suelo hasta en un 1% (**Tabla 22**, ensayo anterior).

De esta manera, la excepción de las muestras H200 y H200-Zn, mencionadas al principio de este apartado, se ajustan con este principio. Según Sun et al. (2020) la adición de 0.5 y 1.5% de hidrochar de madera y pasto obtenido a 260 °C cambia la composición de CO del suelo hacia moléculas de carbono de mayor peso molecular y estabilidad térmica, y más compuestos aromáticos. Por otra parte, reduce los hidratos de carbono, la polaridad y un 8-9% de contenido de CO al final del tiempo de incubación respecto a los valores iniciales. Los autores describen los últimos efectos como consecuencia de un metabolismo microbiano especial; sin embargo, esto solo sería posible hasta que los compuestos de carbono lábiles se consuman, lo que lleva a un contenido de materia orgánica (MO) más evolucionado y recalcitrante, como explican Comino et al. (2019) que utilizaron SCG como enmienda. A pesar del proceso de carbonización aplicado a los hidrochars, sus compuestos más degradables tienen un carácter lábil dominante que aún los hace propicios para una primera actividad biológica (Cervera-Mata, et al., 2022) y explica la variación del CO a lo largo del tiempo de cultivo.

Tabla 24. Efectos de los SCG, los hidrochars de SCG y sus bio-quelatos sobre las propiedades del suelo después de 40 días de cultivo.

Tratamiento	pH	CE ₂₅ (dS/m)	CO (%)
<i>Ensayo Zn</i>			
Control	8.37 ± 0.05 ^{f,g}	0.79 ± 0.05 ^{a,b}	1.10 ± 0.07 ^a
Control-Zn	8.31 ± 0.02 ^{e,f,g}	0.88 ± 0.07 ^{a,b}	1.02 ± 0.08 ^a
SCG-1	8.26 ± 0.12 ^{c,d,e,f}	0.82 ± 0.13 ^{a,b}	1.25 ± 0.25 ^a
H160-1	8.18 ± 0.03 ^{c,d}	0.90 ± 0.07 ^{a,b}	1.32 ± 0.10 ^a
H200-1	7.75 ± 0.03 ^a	1.39 ± 0.15 ^d	2.96 ± 0.43 ^b
SCG-Zn-1	8.19 ± 0.02 ^{c,d}	0.90 ± 0.09 ^{a,b}	1.14 ± 0.04 ^a
H160-Zn-1	8.15 ± 0.02 ^c	0.92 ± 0.07 ^{a,b}	1.33 ± 0.13 ^a
H200-Zn-1	7.85 ± 0.05 ^b	1.15 ± 0.06 ^c	3.02 ± 0.19 ^b
SCG-2	8.41 ± 0.02 ^g	0.70 ± 0.03 ^a	1.31 ± 0.08 ^a
H160-2	8.33 ± 0.02 ^{e,f,g}	0.83 ± 0.02 ^{a,b}	1.34 ± 0.13 ^a
H200-2	8.28 ± 0.02 ^{d,e,f}	0.87 ± 0.03 ^{a,b}	1.31 ± 0.04 ^a
SCG-Zn-2	8.31 ± 0.03 ^{e,f,g}	0.83 ± 0.10 ^{a,b}	1.22 ± 0.03 ^a
H160-Zn-2	8.25 ± 0.02 ^{c,d,e,f}	0.94 ± 0.06 ^{a,b}	1.28 ± 0.06 ^a
H200-Zn-2	8.22 ± 0.02 ^{c,d,e}	0.95 ± 0.10 ^b	1.38 ± 0.06 ^a
<i>Ensayo Fe</i>			
Control	8.37 ± 0.03 ^{c,d}	0.84 ± 0.02	0.96 ± 0.05
Control-Fe	8.36 ± 0.02 ^{c,d}	0.97 ± 0.06	1.06 ± 0.16
SCG-1	8.41 ± 0.13 ^d	0.90 ± 0.16	1.01 ± 0.04
H160-1	8.25 ± 0.07 ^{a,b,c}	0.96 ± 0.12	1.20 ± 0.22
H200-1	8.18 ± 0.03 ^{a,b}	1.05 ± 0.10	1.24 ± 0.13
SCG-Fe-1	8.31 ± 0.04 ^{b,c,d}	0.99 ± 0.12	1.14 ± 0.21
H160-Fe-1	8.25 ± 0.05 ^{a,b,c}	0.99 ± 0.11	1.00 ± 0.22
H200-Fe-1	8.26 ± 0.06 ^{a,b,c}	0.92 ± 0.10	1.14 ± 0.13
SCG-2	8.22 ± 0.01 ^{a,b,c}	0.98 ± 0.07	1.14 ± 0.20
H160-2	8.21 ± 0.04 ^{a,b}	1.11 ± 0.07	1.20 ± 0.13
H200-2	8.14 ± 0.00 ^a	1.06 ± 0.05	1.33 ± 0.10
SCG-Fe-2	8.19 ± 0.06 ^{a,b}	1.06 ± 0.09	1.38 ± 0.15
H160-Fe-2	8.22 ± 0.04 ^{a,b}	1.01 ± 0.01	1.24 ± 0.10
H200-Fe-2	8.15 ± 0.04 ^a	1.06 ± 0.11	1.36 ± 0.08

Control: solo NPK; Control-Zn/Fe: quelato comercial + NPK; SCG: posos de café; H160: hidrochar producido a 160 °C; H200: hidrochar producido a 200 °C; SCG-Zn/Fe: bio-quelatos de SCG; H160-Zn/Fe: bio-quelatos de H160; H200-Zn/Fe: bio-quelatos de H200. Diferentes números en las muestras indican el ensayo: 1) bio-quelatos añadidos a 10 mg de mineral por kg de suelo; 2) 0.5% de bio-producto. Diferentes letras en la misma columna de ensayo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Valores expresados como media ± SD ($n = 3$).

4.6.2. Efectos sobre el crecimiento de las plantas

Para evaluar los efectos sobre el crecimiento de las plantas, se analizaron el peso fresco (PF) y el peso seco (PS). La

Figura 27A muestra los resultados de los dos ensayos de Zn. Los bio-productos agregados causaron una limitación significativa ($p < 0.05$) en el crecimiento de la planta excepto los SCG y el quelato de SCG a una concentración mineral fija (SCG-Zn-1). El efecto negativo causado por los hidrochars de SCG fue más evidente en los ensayos con una concentración mineral fija que con una dosis fija de bio-producto. De acuerdo con esto, los bio-productos agregados en cantidades iguales produjeron casi el mismo efecto independientemente de la temperatura del HTC y/o la ausencia o presencia de complejo mineral: una disminución promedio del 40% del PF, pero solo del 14% del PS, en comparación con el control; mientras que el ensayo de concentración mineral fija sugiere un aumento en los efectos secundarios atribuidos a la mayor cantidad de bio-producto agregado. Este hecho corrobora lo discutido hasta ahora sobre el patrón de que, a mayor cantidad, mayor efecto negativo.

Los dos ensayos de Fe (**Figura 26B**) también mostraron el mismo patrón. La disminución promedio de PF y PS cuando las cantidades de bio-productos son iguales (ensayo Fe-2) son 46% y 31%, respectivamente. Además, hay una doble disminución de PS en contraste con el ensayo de Zn. La razón de esto último puede deberse a las diferentes condiciones iniciales de las lechugas baby utilizadas en los ensayos de Zn y Fe, por lo que se descarta una estimulación adicional de Zn sobre el crecimiento de la planta.

La limitación del crecimiento de las plantas se puede atribuir principalmente a la composición de SCG en cafeína, polifenoles y taninos (Leifa, et al., 2000; Cervera-Mata, et al., 2020) que se describen no solo como fitotóxicos sino también como ecotóxico (Janissen & Huynh, 2018). Varios autores reportaron este efecto tóxico a diferentes dosis de SCG para lechuga (2.5, 10%) (Cervera-Mata, et al., 2018) y para plántulas de pino piñonero –también rico en polifenoles y taninos– a dosis de 10, 20, 30 y 100% (Caliskan, et al., 2020). Por el contrario, algunos otros autores describen una mejora del peso seco en la planta cuando se usa en un suelo arenoso pobre en minerales (Gomes, et al., 2013; Kasongo, et al., 2013). Diferentes tratamientos podrían conducir a suprimir este efecto

fitotóxico (vermicompost y pirólisis a 400 °C), mientras que otros tratamientos (lavado con etanol:agua, carbonización hidrotermal) condujeron a un aumento de este efecto, al aumentar también el contenido de polifenoles. Por lo tanto, ya que la HTC aumentó el contenido de polifenoles totales en los hidrochars (**Tabla 14**), aumentó la toxicidad. Nuestros resultados también son consistentes con lo reportado por Rillig et al. (2010) para el uso de hidrochar a partir de astillas de raíz de remolacha.

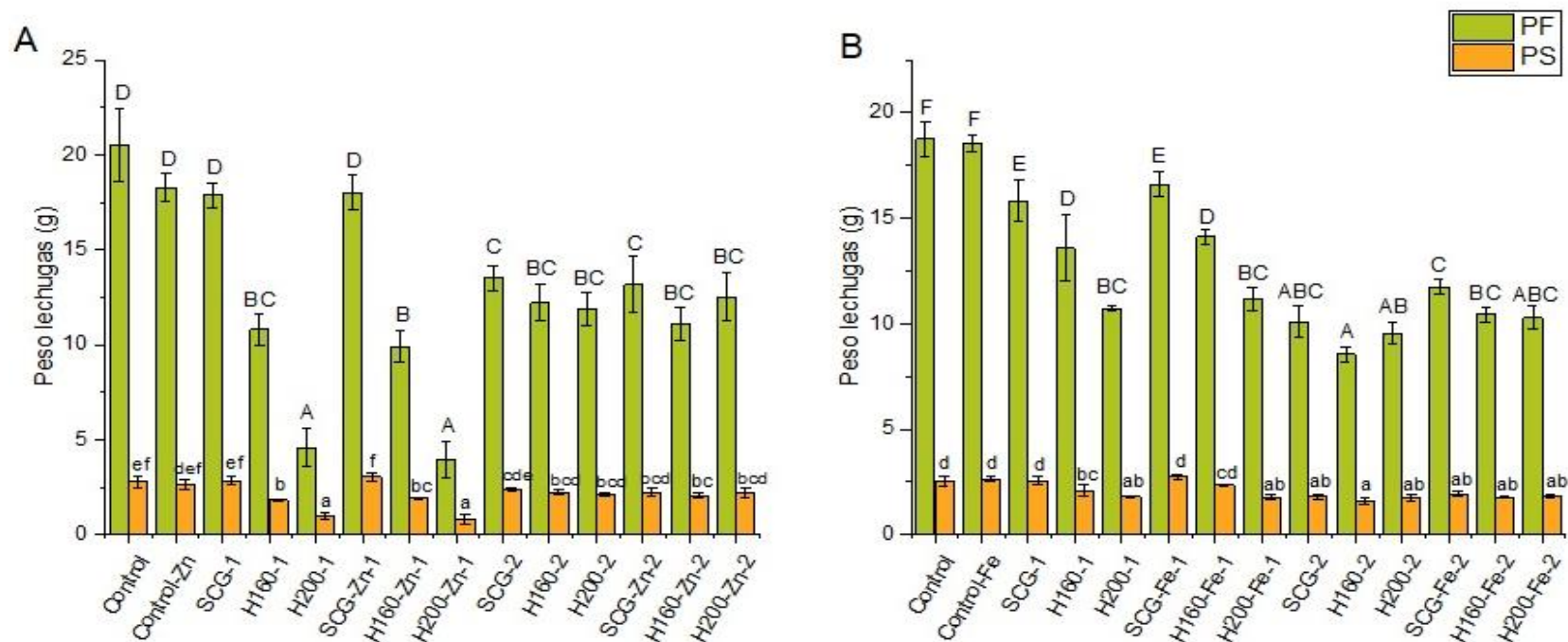


Figura 27. Peso fresco (PF) y peso seco (PS) de las lechugas después de 40 días de cultivo. A) Ensayo de Zn; B) Ensayo de Fe. Diferentes números en las muestras indican el ensayo: (1) bio-quelados a 10 mg de mineral por kg de suelo; (2) 0.5% de bio-producto. Control: solo NPK; Control-Zn/Control-Fe: quelato comercial + NPK; SCG: posos de café; H160: hidrochar obtenido a 160 °C; H200: hidrochar obtenido a 200 °C; SCG-Zn o Fe: bio-quelatos de SCG; H160-Zn/Fe: bio-quelatos de H160; H200-Zn/Fe: bio-quelatos de H200. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=3$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en PF mientras que letras minúsculas lo hacen en PS.

En general, tanto en el caso del Zn como en el caso del Fe, los bio-quelatos de SCG agregados en pequeñas cantidades (aprox. 0.17 %) parecen ser los que menos afectan el crecimiento de las plantas, ya que el PF no se vio afectado drásticamente y el PS fue igual al de los controles ($p > 0.05$).

4.6.3. Biofortificación agronómica de Zn y Fe. Parámetros de evaluación.

Zn

Solo SCG-Zn-2 mostró una concentración de Zn significativamente mayor ($p < 0.05$), un aumento del 91% en comparación con el control (**Tabla 25**). Además, ningún bio-producto pudo alcanzar la concentración del quelato comercial (control-Zn). Esto también se reflejó en los bajos valores de eficiencia de utilización, ya que la gran mayoría son negativos. Por el contrario, Cervera-Mata et al. (2021a) reportaron un aumento significativo en la concentración de este micronutriente en hojas de lechuga con los bio-quelatos de SCG y melanoidinas (SCG-Zn: 416%, Mel-Zn: 177%). El mayor contenido de Zn de los SCG funcionalizados utilizado en dicho estudio (17924 mg/kg) en comparación con la obtenida en este trabajo (6009 mg/kg) puede explicar estas diferencias. La composición del suelo también juega un papel importante en la movilización de este mineral. Las formas intercambiables de Zn generalmente se encuentran en las fracciones de suelo de textura fina (Adriano, 2001), lo que significa que el tipo arcilloso facilita la movilización y posterior absorción de este mineral por parte de las plantas. La composición arcillosa del suelo utilizado por Cervera-Mata et al. (2021a) fue del 58% mientras que el utilizado en este trabajo es del 12.5%.

El contenido de Zn disponible en el suelo se ve afectado positivamente por los bio-quelatos. Todos los bio-quelatos ensayados aumentaron más de 5 veces la concentración de Zn, mientras que el quelato comercial (control-Zn) solo lo aumentó en 4 veces (**Tabla 25**). El ensayo Zn-2 mostró que el quelato de SCG crea la mayor reserva de Zn. Sin embargo, la mejor eficiencia de reserva disponible (ERD) la proporciona el quelato de H160 en ambas modalidades de aplicación.

El factor de transferencia (FT) es un indicador de la disponibilidad de metales en las plantas. Cuanto más alto es, más movilidad tiene el metal entre el suelo y la planta. Por el contrario, cuanto menor sea, se puede sospechar una deficiencia del nutriente (Almendros, et al., 2013). Los TF de los bio-quelatos son mucho más bajos que los de los hidrochars de SCG debido a la mayor reserva creada en el suelo que en la planta. Esto podría suponer que la biofortificación de Zn de la planta en el caso de los bio-quelados podría ocurrir gradualmente en los siguientes ciclos de cultivo actuando como un quelato de liberación lenta. Cervera-Mata et al. (2021a) reportaron un TF cercano a 0.01 para el quelato SCG-Zn en concentración de 89.61 mg Zn/kg de suelo, incluso inferior al obtenido en este trabajo.

Fe

El Fe mostró una tendencia general de biofortificación con la adición de todos los bio-productos en comparación con el control. Solo el bio-quelato de SCG adicionado al 0.5% (SCG-Fe-2) fue comparable al quelato comercial (control-Fe). Cervera-Mata et al. (2021a) obtuvieron una menor mejora en el contenido de Fe en lechuga en comparación con el quelato comercial, con el uso de SCG y melanoidinas funcionalizadas con Fe. Por otro lado, la eficiencia de utilización de los bio-quelatos ensayados fue hasta 4 veces mayor que la del quelato comercial (**Tabla 25**), lo que significa que un mayor porcentaje de Fe contenido en los bio-quelatos estaba disponible para ser utilizado por las plantas.

Según Adriano (2001), el pH del suelo influye en el rendimiento de la planta en términos de absorción de minerales. El Zn y el Fe se movilizan mejor en medios ligeramente ácidos (6.5) y aunque el pH del suelo 1 utilizado en este experimento se aproxima a 9 (**Tabla 6**), la acidez de los bio-productos pudo haber ayudado a la movilización de los elementos a través del contacto directo con las raíces, siendo mayor el Fe que el Zn debido a la dependencia más estricta del primero por los medios ácidos (Arizmendi et al., 2011). Un menor, pero no nulo enriquecimiento en Zn en las plantas fue reportado por Cervera-Mata et al. (2018) con el uso de los SCG, quienes luego observaron una correlación negativa entre el contenido mineral de la planta (Zn, Fe) y los elevados porcentajes de SCG (Cervera-Mata et al., 2019). La capacidad de los SCG de complejar metales por varios mecanismos puede justificar este comportamiento.

En cuanto al contenido de Fe disponible en el suelo, solo los bio-quelatos adicionados al 0.5% (ensayo Fe-2, **Tabla 25**) mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$). Este enriquecimiento del suelo puede estar relacionado con el contenido intrínseco de Fe en los SCG y sus hidrochars (SnAc,

Tabla 21). Esto puede sugerir una liberación continua del mineral por parte de los bio-quelatos. Este aumento de Fe producido por la adición de los hidrochars de SCG al 0.5% es comparable al quelato comercial (control-Fe) que muestra valores de ERD aún más altos (**Tabla 25**). La cantidad de bio-producto agregado podría marcar la diferencia entre los hidrochars y los bio-quelatos en términos de una movilización más rápida de micronutrientes, sobre todo en el caso particular del Fe. El bio-quelato SCG-Fe reportado previamente por Cervera-Mata et al. (2021a) incrementó el contenido de Fe en el suelo en un 78%, sin embargo, la disponibilidad del mineral fue menor que la del quelato comercial (control-Fe).

Los valores de FT obtenidos para este micronutriente muestran un mejor equilibrio en el sistema suelo-planta que los encontrados para el Zn (**Tabla 25**). La misma diferencia fue reportada por Cervera-Mata et al. (2021a) para bio-quelatos de SCG. Además, cabe señalar que el FT de SCG-Fe a una concentración de 10 mg/kg (SCG-Fe-1) es igual al control-Fe, pero se duplica cuando se adiciona al 0.5% (SCG-Fe-2). Estos resultados indican que los SCG son buenos movilizadores de Fe. Este efecto podría, hipotéticamente, ser potenciado por el aumento de la dosis utilizada en el suelo si los bio-productos no presentaran efectos fitotóxicos.

El contenido intrínseco de Zn y Fe en los SCG y sus hidrochars no puede considerarse como una gran fuente de minerales (

Tabla 21). La literatura respalda estos bio-productos como buenos movilizadores de Fe y Zn independientemente de su funcionalización. Cervera-Mata et al. (2020) reportaron variados aumentos de minerales con el uso de los SCG y sus hidrochars, no solo en el suelo, sino también en las plantas (lechuga), especialmente el Fe. Para comprender por qué el Fe funciona mejor que el Zn, puede ser útil comprender mejor las interacciones de biodisponibilidad mineral.

Tabla 25. Contenido mineral en suelo y planta y parámetros de evaluación de la eficiencia.

Tratamiento	Contenido mineral en planta (mg/100 g)	EU (%)	Contenido mineral disponible en suelo (mg/kg)	ERD (%)	FT
<i>Zn</i>					
Control	0.11 ± 0.01 ^a	-	1.19 ± 0.12 ^a	-	-
Control-Zn	0.65 ± 0.10 ^c	0.34	4.71 ± 0.11 ^b	4.92	0.06
SCG-1	0.11 ± 0.01 ^a	-0.09	1.15 ± 0.02 ^a	-0.40	0.09
H160-1	0.13 ± 0.02 ^a	-0.23	1.28 ± 0.08 ^a	0.85	0.10
H200-1	0.19 ± 0.01 ^{a,b}	-0.36	1.52 ± 0.24 ^a	3.29	0.12
SCG-Zn-1	0.18 ± 0.02 ^{a,b}	0.22	5.95 ± 0.25 ^{c,d}	47.54	0.03
H160-Zn-1	0.18 ± 0.03 ^{a,b}	-0.12	6.37 ± 0.31 ^d	51.82	0.03
H200-Zn-1	0.20 ± 0.01 ^{a,b}	-0.38	5.70 ± 0.16 ^{c,d}	45.11	0.03
SCG-2	0.14 ± 0.03 ^a	-0.04	1.21 ± 0.07 ^a	0.05	0.11
H160-2	0.14 ± 0.04 ^a	-0.18	1.16 ± 0.05 ^a	-0.38	0.12
H200-2	0.14 ± 0.02 ^a	-0.88	1.20 ± 0.13 ^a	0.51	0.12
SCG-Zn-2	0.26 ± 0.03 ^b	0.10	14.71 ± 0.76 ^e	45.00	0.02
H160-Zn-2	0.21 ± 0.05 ^{a,b}	0.00	5.31 ± 0.38 ^{b,c}	47.17	0.04
H200-Zn-2	0.15 ± 0.01 ^a	-0.52	1.89 ± 0.13 ^a	42.31	0.08
<i>Fe</i>					
Control	1.70 ± 1.09 ^a	-	5.54 ± 0.29 ^a	-	-
Control-Fe	11.11 ± 0.64 ^c	2.61	9.12 ± 0.33 ^e	2.15	0.57
SCG-1	2.65 ± 0.53 ^{a,b}	2.51	5.92 ± 0.61 ^{a,b}	3.77	0.45
H160-1	1.76 ± 0.42 ^a	-2.02	5.76 ± 0.14 ^{a,b}	2.18	0.31
H200-1	6.93 ± 2.62 ^b	10.59	6.02 ± 0.14 ^{a,b}	4.78	1.15
SCG-Fe-1	3.58 ± 0.46 ^{a,b}	6.88	6.30 ± 0.18 ^{a,b}	7.55	0.57
H160-Fe-1	3.70 ± 1.00 ^{a,b}	5.06	6.34 ± 0.15 ^{a,b}	7.98	0.58
H200-Fe-1	4.62 ± 2.83 ^{a,b}	4.91	6.67 ± 0.43 ^{b,c}	11.27	0.69
SCG-2	6.55 ± 3.07 ^b	2.89	5.87 ± 0.13 ^{a,b}	1.13	1.11

H160-2	5.03 ± 0.90 ^{a,b}	1.45	5.57 ± 0.50 ^a	0.17	0.90
H200-2	4.80 ± 0.13 ^{a,b}	3.17	5.72 ± 0.25 ^{a,b}	1.61	0.84
SCG-Fe-2	10.14 ± 1.54 ^c	7.39	8.56 ± 0.20 ^{d,e}	10.25	1.18
H160-Fe-2	4.21 ± 0.79 ^{a,b}	1.58	8.07 ± 0.23 ^d	13.25	0.52
H200-Fe-2	6.60 ± 1.55 ^b	8.20	7.20 ± 0.60 ^c	15.20	0.92

Control: solo NPK; Control-Zn/Fe: quelato comercial + NPK; SCG: posos de café; H160: hidrochar obtenido a 160 °C; H200: hidrochar obtenido a 200 °C; SCG-Zn/Fe: bio-quelatos de SCG; H160-Zn/Fe: bio-quelatos de H160; H200-Zn/Fe: bio-quelatos de H200; EU: Eficiencia de utilización calculada con Eq. (7); ERD: Eficiencia de la reserva disponible calculada con la Ec. (8); FT: Factor de transferencia calculado con la Ec. (9). Diferentes números en las muestras indican el ensayo: 1) bio-quelatos a 10 mg de mineral por kg de suelo; 2) 0.5% de bio-producto. Diferentes letras en la misma columna de ensayo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Valores expresados como media ± SD ($n = 3$).

4.6.4. Estudio de la relación entre las variables de suelo y planta ensayadas

El análisis de componentes principales (PCA, **Figura 28**) y los coeficientes de correlación (**Tabla 26-29**) se calcularon para una matriz por ensayo que contenía los parámetros analizados para lechuga (contenido de Zn y Fe, PF, PS) y suelo (Zn y Fe biodisponibles, pH, CE₂₅, CO). Solo se consideraron las correlaciones significativas ($p < 0.01$).

En ambos ensayos y para ambos elementos, existe un patrón en el que el PF, PS y pH se correlacionan positivamente entre sí y, al mismo tiempo, se correlacionan negativamente con CE₂₅ y CO. Estos resultados corroboran el aumento proporcional de la CE₂₅, y la disminución del pH, PF y PS, junto con la cantidad de bio-producto agregado (CO). Los efectos fitotóxicos se manifiestan cuando los bio-productos son añadidos al suelo en cantidades mayores o iguales al 0.5%. Esto es particularmente significativo para H160 y H200. También existe una fuerte correlación entre los contenidos minerales de la planta y del suelo en todos los experimentos, sin embargo, esta correlación parece no depender del PF, PS, pH, CE₂₅ o CO.

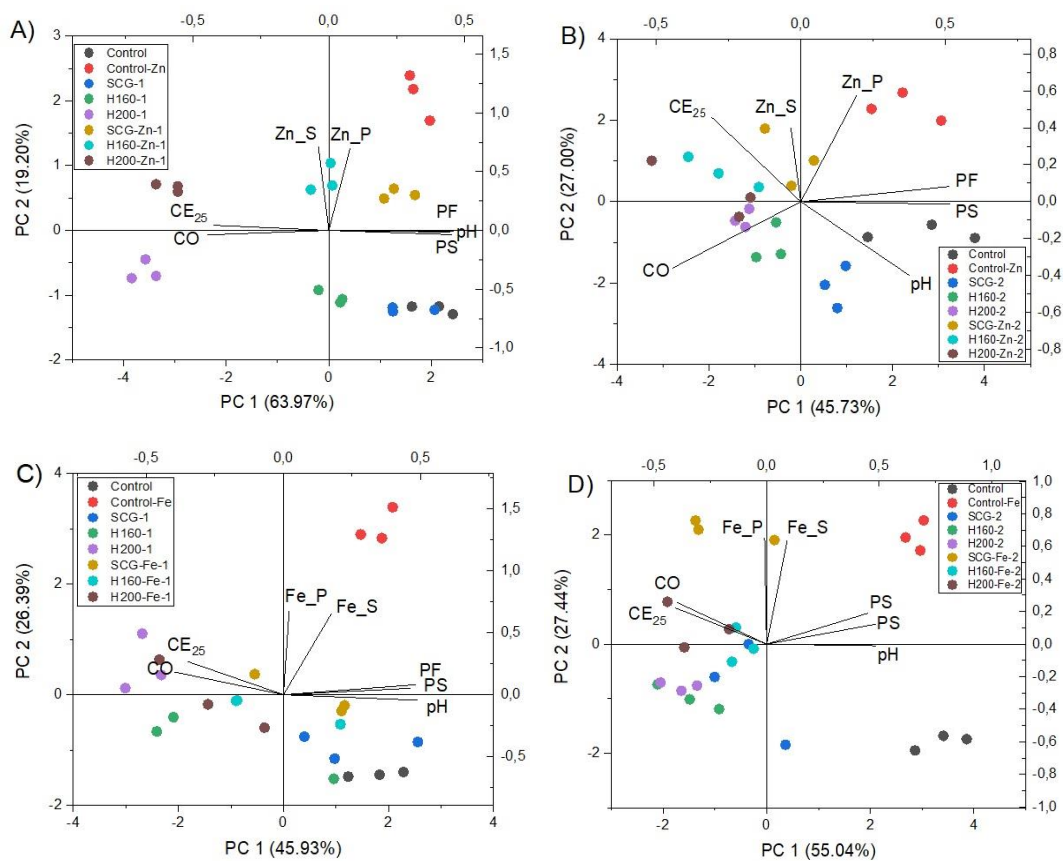


Figura 28. Gráficos superpuestos de puntajes de PCA obtenidos para los tratamientos (PC2 vs PC1) y los parámetros de suelo y planta. A) Ensayo de Zn con bio-quelatos a 10 mg/kg de suelo; B) Ensayo Zn al 0.5% del bio-producto; C) Ensayo Fe con bio-quelatos a 10 mg/kg de suelo; D) Ensayo Fe al 0.5% de bio-producto. Control: solo NPK; Control-Zn/Fe: quelato comercial + NPK; SCG: posos de café; H160: hidrochar obtenido a 160 °C; H200: hidrochar obtenido a 200 °C; SCG-Zn/Fe: bio-quelatos de SCG; H160-Zn/Fe: bio-quelatos de H160; H200-Zn/Fe: bio-quelatos de H200; CO: carbono orgánico; X_P: contenido de micronutriente en la planta; X_S: micronutriente disponible en el suelo; PF: peso fresco; PS: peso seco; CE₂₅: conductividad eléctrica medida a 25 °C.

La **Figura 28** también muestra que la distribución de los bio-productos según el parámetro en el que más influyen resulta coherente: los bio-productos de H200 se ubican cerca de CE₂₅ y CO; los bio-productos de SCG se encuentran cerca de PF, PS y pH; mientras que los bio-productos de H160 suelen ser contrarios al contenido de Fe en las plantas y el suelo, lo que sugiere que este es el bio-producto que tiene menos efecto en la biofortificación de Fe. Es notable que los bio-quelatos de SCG aparecen constantemente cerca de los contenidos minerales de la planta y el suelo en cada gráfico, lo que significa que es el bio-producto que más influye en la movilización y biofortificación de Zn y Fe, como se informó en las secciones anteriores.

Tabla 26. Coeficientes de correlación de los parámetros analizados en el ensayo Zn-1.

	pH	CE ₂₅	CO	Zn_S	Zn_P	PS	PF
pH	1						
CE ₂₅	-0.915**	1					
CO	-0.917**	0.811	1				
Zn_S	-0.102	0.025	0.023	1			
Zn_P	0.169	-0.021	-0.163	0.339	1		
PS	0.841	-0.764**	-0.874**	-0.048	0.098	1	
PF	0.886	-0.787**	-0.855**	-0.155	0.171	0.968**	1

**Correlación significativa al nivel de 0.01.

Zn_S, contenido de Zn en suelo; Zn_P, contenido de Zn en planta.

Tabla 27. Coeficientes de correlación de los parámetros analizados en el ensayo Zn-2.

	pH	CE ₂₅	CO	Zn_S	Zn_P	PS	PF
pH	1						
CE ₂₅	-0.772**	1					
CO	-0.258	0.124	1				
Zn_S	-0.155	0.105	-0.207	1			
Zn_P	-0.102	0.220	-0.613**	0.316	1		
PS	0.437	-0.316	-0.726**	-0.112	0.322	1	
PF	0.505*	-0.405*	-0.674	-0.162	0.205	0.923**	1

**Correlación significativa al nivel de 0.01.

Zn_S, contenido de Zn en suelo; Zn_P, contenido de Zn en planta.

Tabla 28. Coeficientes de correlación de los parámetros analizados en el ensayo Fe-1.

	pH	CE ₂₅	CO	Fe_S	Fe_P	PS	PF
pH	1						
CE ₂₅	-0.745**	1					
CO	-0.655**	0.619**	1				
Fe_S	0.044	0.059	0.151	1			
Fe_P	-0.174	0.231	0.324*	0.656**	1		
PS	0.742**	-0.476**	-0.553**	0.137	-0.129	1	
PF	0.698**	-0.398**	-0.505**	0.090	-0.132	0.940**	1

**Correlación significativa al nivel de 0.01.

Fe_S, contenido de Fe en suelo; Fe_P, contenido de Fe en planta.

Tabla 29. Coeficientes de correlación de los parámetros analizados en el ensayo Fe-2.

	pH	CE ₂₅	CO	Fe_S	Fe_P	PS	PF
pH	1						
CE ₂₅	-0.746**	1					
CO	-0.760**	0.635**	1				
Fe_S	0.152	0.071	0.135	1			
Fe_P	0.001	0.260	0.259	0.683**	1		
PS	0.856**	-0.643**	-0.607**	0.285	0.082	1	
PF	0.785**	-0.529**	-0.498*	0.309	0.172	0.963**	1

**Correlación significativa al nivel de 0.01.

Fe_S, contenido de Fe en suelo; Fe_P, contenido de Fe en planta.

Consideraciones finales

Los hidrochars de SCG pueden retener y movilizar el Fe mejor que el Zn. Un factor determinante que afectó la absorción de minerales y la toxicidad de los hidrochars fueron las temperaturas más altas en el proceso HTC, por lo tanto, se recomienda el estudio de la mejora de las partículas de hidrochar con la aplicación de un postratamiento. La aplicación de los bio-quelatos basada en cantidad (dosis), en lugar de concentración de micronutriente, resultó mejor para sobrellevar los efectos de fitotoxicidad y alcanzar significativos niveles de biofortificación. El mayor aumento del contenido mineral en planta se obtuvo con SCG funcionalizados con Fe a una dosis fija de 0.5%. Este bio-producto mostró un comportamiento de biofortificación similar a un quelato comercial, aunque todavía con cierto grado de afectación al crecimiento de la biomasa. Estos resultados sirven como referencia para el planteamiento de ensayos

futuros en busca del balance entre biofortificación versus fitotoxicidad. El enriquecimiento de plantas con Zn fue menos efectivo, lo que podría estar relacionado con el tipo de suelo (franco-limoso). Sin embargo, se necesita más investigación para comprender la menor asimilación de este micronutriente. No hubo influencia negativa con la adición de todos los bio-productos ensayados sobre las propiedades del suelo, por el contrario, se creó una reserva mineral importante para los siguientes ciclos de cultivo.

4.7. Uso de los SCG y sus hidrochars activados y funcionalizados como bio-quelatos para la biofortificación agronómica de Fe.

Este estudio responde a lo encontrado en el Ensayo 7; sin embargo, para efectos de una mejor profundidad de análisis, esta sección se ha dividido en dos partes correspondientes a cada elemento ensayado: (1) Fe y (2) Zn.

4.7.1. Fe

Preámbulo

Generalmente los suelos agrícolas no tienen deficiencia de hierro, sino que este elemento no se encuentra disponible para ser utilizado por la planta. Los altos contenidos de carbonatos, así como el elevado pH del suelo son algunos de los factores que afectan la biodisponibilidad del Fe; por tal motivo, la aplicación foliar ha sido la técnica de biofortificación agronómica más estudiada en los últimos años (Zulfiqar, et al., 2020; Pal, et al., 2021; Preciado-Rangel, et al., 2022). Sin embargo, a pesar de los inconvenientes, la aplicación en el suelo sigue siendo un desafío que continúa despertando interés. El uso de microorganismos productores de sideróforos (Patel, et al., 2018), así como bio-quelatos obtenidos a partir de desechos agroindustriales como propusieron Cervera-Mata et al. (2021a) con los SCG y se ha probado en este trabajo también con los hidrochars de SCG (Ensayo 6), son nuevas alternativas exploradas en la aplicación en el suelo para movilizar el hierro no disponible y/o aportar más cantidad asimilable.

4.7.1.1. Efectos sobre el suelo

La aplicación de bio-quelatos no mostró una influencia significativa en ninguna de las propiedades del suelo analizadas (**Tabla 30**): se mantienen el pH y la CE₂₅, así como el contenido disponible de micronutrientes.

Tabla 30. Efectos sobre las propiedades del suelo de los bio-quelatos activados después de 40 días de cultivo.

Tratamiento	pH	CE ₂₅ (dS/m)	Micronutriente asimilable (mg/kg)			
			Fe	Zn	Mn	Cu
Control	8.07 ± 0.04	0.41 ± 0.08	6.72 ± 0.15	1.50 ± 0.06	7.89 ± 0.80	2.34 ± 0.09
Control-Fe	8.07 ± 0.03	0.43 ± 0.05	8.65 ± 1.55	1.40 ± 0.22	8.18 ± 1.36	1.93 ± 0.33
ASCG-Fe	8.03 ± 0.02	0.47 ± 0.03	7.76 ± 0.37	1.53 ± 0.07	9.49 ± 0.86	2.40 ± 0.09
AH160-Fe	8.07 ± 0.06	0.40 ± 0.07	8.30 ± 0.47	1.53 ± 0.07	9.28 ± 0.62	2.37 ± 0.04
AH180-Fe	8.09 ± 0.02	0.41 ± 0.06	8.56 ± 0.63	1.50 ± 0.06	9.35 ± 0.62	2.37 ± 0.04
AH200-Fe	8.09 ± 0.04	0.41 ± 0.05	7.79 ± 0.01	1.08 ± 0.62	8.10 ± 1.13	1.90 ± 0.99

Valores expresados como media ± SD (*n*= 4). La ausencia de letras indica ausencia de diferencias estadísticamente significativas (*p* <0.05).

4.7.1.2. Efectos sobre la planta

La apariencia física de las plantas fue similar al final de los 40 días de cultivo (**Figura 29**). No se encontraron diferencias visuales en cuanto a volumen, tamaño o intensidad de color de la parte comestible entre los tratamientos. Todas las lechugas tuvieron un desarrollo homogéneo desde el día 0 de siembra hasta la cosecha. No se encontraron signos de fitotoxicidad.

Los valores de PF y PS tampoco se vieron afectados significativamente por la adición de bio-quelatos (**Figura 30**. Peso fresco (PF) y peso seco (PS) de las lechugas después de 40 días de cultivo. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias (*n*= 4). **Figura 30**). Todas las plantas lograron un PF promedio de 28.28 ± 1.39 g y un PS promedio de 2.18 ± 0.19 g.

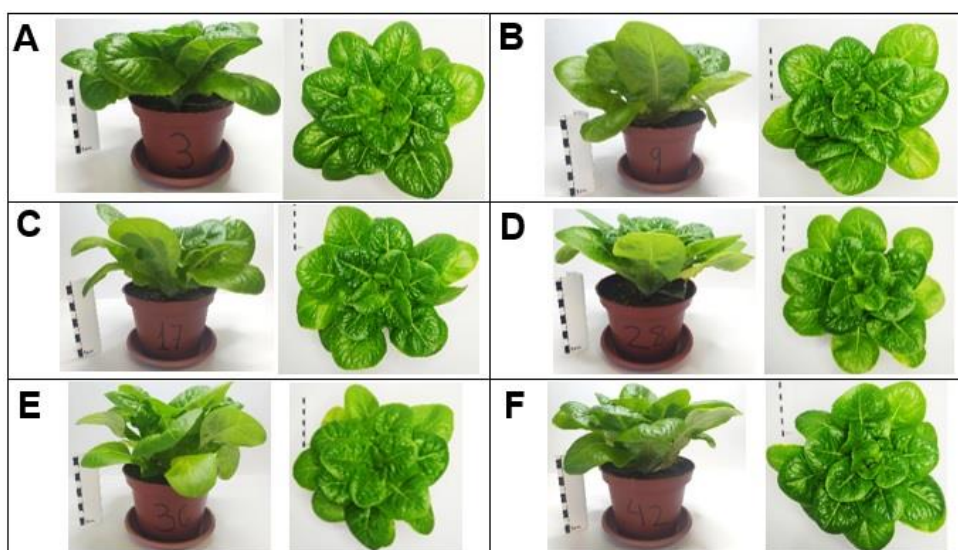


Figura 29. Imágenes (planos axial y cenital) de lechugas de cada tratamiento después de 40 días de cultivo. A) Control; B) Control-Fe; C) ASCG-Fe; D) AH160-Fe; E) AH180-Fe; F) AH200-Fe. Se seleccionó uno por tratamiento.

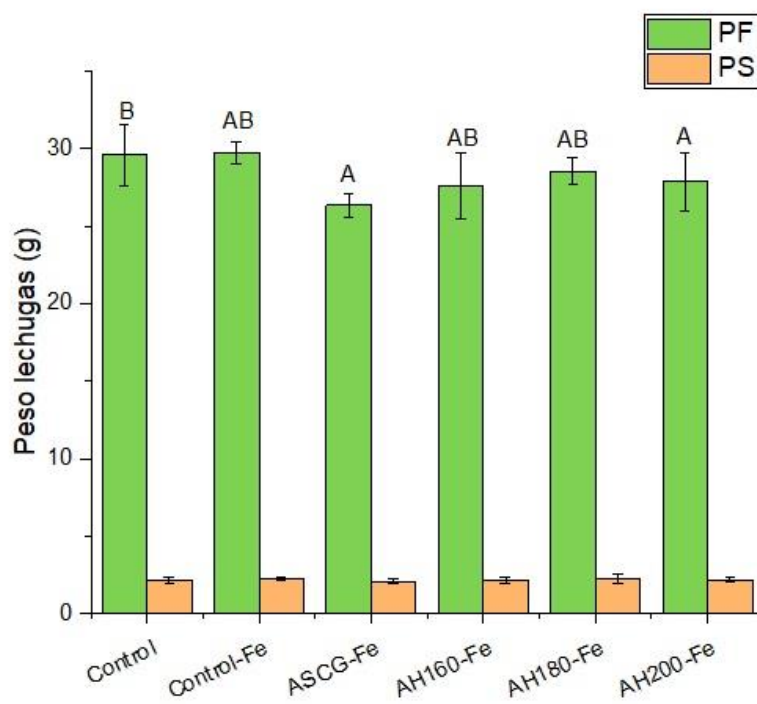


Figura 30. Peso fresco (PF) y peso seco (PS) de las lechugas después de 40 días de cultivo. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n= 4$). Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las columnas sin ninguna letra no mostraron diferencias significativas.

La aplicación de los bio-quelatos previamente activados no afectó negativamente el normal desarrollo de las plantas (

Figura 29). Este resultado es notable ya que el uso de SCG y sus hidrocarburos se ha asociado con efectos fitotóxicos (Hardgrove and Livesley, 2016). Cervera-Mata et al. (2018) encontraron una evidente limitación de biomasa en lechugas cultivadas con SCG a dosis de 2.5% y 10%, señalando que el grado de fitotoxicidad presente en las plantas es proporcional a la dosis utilizada. Lo mismo se reportó para los hidrochars SCG (H175, H185) a dosis aún menores, desde el 1% (Cervera-Mata et al., 2021b) y finalmente para la aplicación de SCG como bio-quelados en dosis del 0.5% (**Figura 27**). En nuestro estudio, la dosis de 0.2% utilizada, la más baja jamás probada para estos bio-productos, ha mostrado resultados favorables en cuanto al control de la fitotoxicidad, así como de las propiedades del suelo (**Tabla 30**). La cantidad de bio-quelatos suministrada al cultivo fue suficiente para el objetivo de biofortificación propuesto (**Figura 31**), que se discutirá más adelante, principalmente debido a la cantidad de Fe contenida en cada bio-producto probado (**Tabla 11**). Sin embargo, la ausencia de fitotoxicidad que se observa claramente no solo en el aspecto morfológico de las lechugas (**Figura 30**) sino también en la uniformidad de los PF y PS (**Figura 30**), puede atribuirse tanto a la baja dosis aplicada como, posiblemente, a la disminución de polifenoles presentes en los bio-quelatos. Según Wilson & Novak (2009), la activación con NaOH conduce a la solubilización de una variedad de compuestos orgánicos que, en el caso de SCG y sus hidrochars, podrían incluir polifenoles. Este hecho podría abrir nuevas posibilidades para el aprovechamiento de estos residuos en el ámbito agrícola, por lo que son necesarios futuros estudios.

4.7.1.3. Biofortificación con hierro e implicaciones sobre otros contenidos de micronutrientes

El contenido de Fe de la planta varía significativamente ($p < 0.05$, **Figura 31**). Se diferencian tres grupos según el contenido de Fe: bajo (0.23 mg/100 g PF), medio (~0.52 mg/100 g PF) y alto (~0.85 mg/100 g PF). Solo las plantas del control pertenecen al primer grupo. El segundo grupo lo forman las plantas cultivadas con AH200-Fe y ASCG-Fe. Estos muestran un aumento de este micronutriente en comparación con el control, pero esto no es tan alto como el control-Fe. Finalmente, el grupo con los valores más altos de contenido de Fe. En este último grupo se encuentran las lechugas cultivadas con los bioquelados AH180-Fe y AH160-Fe, y control-Fe. Estos tratamientos produjeron lechugas con tres veces más contenido de Fe que el control.

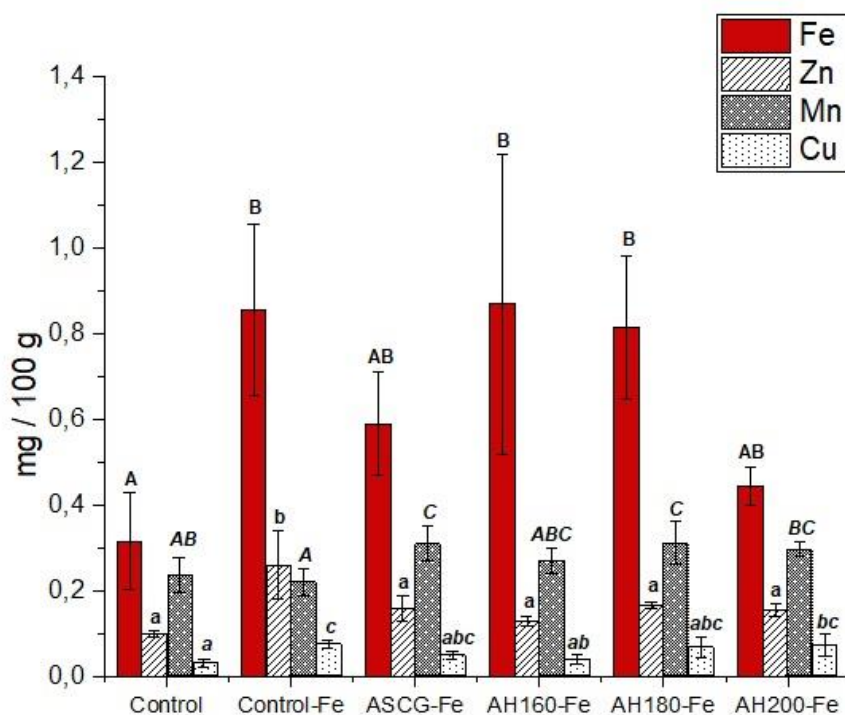


Figura 31. Contenido de Fe y otros micronutrientes expresados en función del peso fresco de la parte comestible de la lechuga en los diferentes tratamientos. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=4$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en contenido de Fe, letras minúsculas en contenido de Zn, letras mayúsculas en cursiva en Mn y letras minúsculas en cursiva en Cu.

Todos los bio-quelatos probados aumentaron los contenidos de Fe en la planta con respecto al control, pero solo AH160-Fe y AH180-Fe mostraron igualar el efecto de biofortificación producido por el control-Fe, 150-171% más Fe que el control (**Figura 31**). Otros productos aplicados al suelo para la fortificación con Fe reportan incrementos del 30% para el caso de melanoidinas funcionalizadas con Fe (Mel-Fe) en lechuga (Cervera-Mata et al., 2021a) y del 340% utilizando cultivos de *Pseudomonas* en frijol mungo (Patel et al., 2018). Sin embargo, este último podría presentar limitaciones para la aplicación en cultivos extensivos debido a los requerimientos de producción, mantenimiento y viabilidad de los organismos vivos.

La **Figura 31** muestra que ninguno de los bio-quelatos ensayados tiene una influencia significativa sobre el contenido de Zn, pero sí sobre los contenidos de Mn y Cu. Todos los bio-quelatos provocaron un aumento de Mn hasta casi un 30% y de Cu hasta un 133%, con respecto al control. Las lechugas tratadas con AH180-Fe presentan el mayor incremento de estos micronutrientes, por el contrario, las tratadas con AH160-Fe presentan las menores variaciones.

Otro parámetro importante que puede verse influenciado por el uso de estos bio-quelatos es la disponibilidad de otros micronutrientes en el suelo y su consecuente variación en el contenido vegetal. El contenido disponible de Zn, Mn y Cu en el suelo no presentó variación por efecto de los bio-quelatos (**Tabla 30**), pero sí se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido vegetal (**Figura 31**). Solo el Mn (29%) y Cu (133%) aumentaron en lechuga. Existen varias afirmaciones en la literatura sobre este tema. Kasongo et al., (2013) reportaron una disminución de Cu, Zn, Mn y Fe con la adición de SCG en dosis de 5, 10 y 20 t/ha en cultivos de raigrás italiano, tanto en plantas como en suelo. Por el contrario, Cervera-Mata et al. (2019) han registrado aumentos de micronutrientes en lechuga proporcionales a la adición de 1-10% de SCG, especialmente V, Co, Mn y Zn, alegando la capacidad de movilización de SCG no solo elementos esenciales, pero también tóxicos. Los hidrochars de SCG también parecen aumentar los contenidos de Zn y Cu tanto en la planta como en el suelo, como lo reporta Cervera-Mata et al. (2020) al probar la adición de H180 como enmienda agrícola a una dosis de

7.5%. En este estudio, los resultados en planta y suelo difieren de los reportados hasta el momento. Dado que se agregó NPK al suelo junto con el bio-producto en todas las pruebas antes mencionadas, la diferencia en los resultados puede depender del tipo de suelo utilizado. Dicho esto, la disminución reportada por Kasongo et al. (2013) se evidenció en un suelo ácido (pH: 5.2) mientras que los aumentos reportados parcialmente en este estudio y totalmente en los realizados por Cervera-Mata et al. (2019, 2020) en un suelo alcalino-neutro (pH: 7-8). El estudio de Cruz et al. (2014) en el que también se observó una tendencia a la reducción, no solo de micronutrientes sino también de macronutrientes, en lechugas cultivadas con SCG a diferentes dosis (2.5% - 20%), se realizó en un suelo ácido (pH en CaCl_2 : 5-6), lo que refuerza esta hipótesis. Por tanto, el aumento o disminución de elementos minerales en las plantas parece estar condicionado por el pH del medio. Según Adriano (2001), la sorción de iones metálicos en el suelo se ve influenciada positivamente por el aumento del pH del suelo. Zn y Mn, por ejemplo, son más móviles a pHs entre 7-8, mientras que Cu a pHs ligeramente más bajos, entre 6-7. El autor también agrega el efecto de la complejación de los iones metálicos con la materia orgánica, lo que ayuda a aumentar su biodisponibilidad. La combinación de estos dos factores podría explicar los resultados encontrados en este estudio, especialmente la movilización de Cu.

4.7.1.4. Balance de Fe y parámetros de evaluación del sistema suelo-planta

Para comprender mejor la dinámica del hierro en nuestro trabajo, es fundamental mencionar que el grado de biofortificación obtenido (**Figura 31**) no parece estar relacionado con el contenido de Fe de cada bio-quelato utilizado (**Tabla 11**). La **Tabla 31** muestra exclusivamente la distribución del Fe aportado por los biofortificantes entre planta y suelo —el primero como contenido de Fe y el segundo como contenido de Fe asimilable— entendidos ambos como “Fe utilizable”, y el resto de Fe no asimilable.

El Fe aprovechable fue uniforme en todos los tratamientos ya que no se encontraron diferencias estadísticas ni en planta ni en suelo entre tratamientos; sin embargo, existe una gran diferencia al comparar este Fe utilizable con el Fe total agregado por los bio-quelatos. Así, por ejemplo, AH200-Fe suministra la mayor cantidad de Fe pero solo el

3.4% representa Fe utilizable. Por el contrario, AH160-Fe tiene 2.5 veces más Fe utilizable (8.6%) que AH200-Fe, a pesar de suministrar menos Fe (**Tabla 31**). Según Rousseau et al. (2019), la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del hierro pueden verse afectadas negativamente por los polifenoles debido, paradójicamente, a la gran afinidad de estos compuestos por este mineral. Aunque esta afinidad es beneficiosa cuando se diseñan bio-quelatos para la unión de minerales (Gulcin & Alwasel, 2022), la formación de complejos particularmente de hierro-polifenol puede ser un problema si el micronutriente no se libera al medio en cantidad suficiente para ser utilizado por los organismos (Cianciosi, et al., 2022). Este efecto limitante de los polifenoles ya se ha abordado con fines de fortificación de alimentos con hierro mediante la exploración de métodos de encapsulación o el uso de agentes complejantes competitivos para garantizar la biodisponibilidad del hierro (McGee & Diosady, 2018). En consecuencia, el contenido de polifenoles en los bio-productos activados vuelve a cobrar importancia para futuros análisis que confirmen la hipótesis anterior ya que, aunque la carga de polifenoles puede haberse reducido tras la activación, la existencia de un contenido remanente aún podría influir en la disponibilidad. de este elemento en bio-quelatos. De la misma manera, así como una parte del Fe no disponible todavía puede ser absorbida en las partículas, otra parte puede fijarse en el suelo como óxidos de Fe afectando la biodisponibilidad del mineral (Adriano, 2001).

Tabla 31. Balance del Fe y parámetros de evaluación en el sistema suelo-planta.

Tratamiento	Fe (mg/maceta)				EU (%)	ERD (%)	FT
	Añadido	Planta	Suelo (asimilable)	No asimilable*			
Control-Fe	4	0.12 ± 0.09	0.89 ± 0.55	2.99	0.24	1.15	0.07
ASCG-Fe	8.08	0.11 ± 0.09	0.42 ± 0.15	7.55	0.77	5.15	0.05
AH160-Fe	8.98	0.14 ± 0.11	0.63 ± 0.19	8.21	1.63	7.05	0.07
AH180-Fe	11.30	0.14 ± 0.05	0.74 ± 0.25	10.42	1.23	6.51	0.07
AH200-Fe	13.62	0.03 ± 0.02	0.43 ± 0.00	13.16	0.23	3.16	0.04

*Calculado por diferencia de los contenidos de Fe de la planta y el suelo por maceta. EU: eficiencia de utilización; ERD: eficiencia de reserva disponible; FT: factor de transferencia. Valores expresados como media ± SD (n= 4).

El análisis de Fe utilizable de los bio-quelatos concuerda con los parámetros de eficiencia que también se muestran en la **Tabla 31**. Considerando la EU, las plantas parecen tener

menor capacidad para usar Fe de AH200-Fe y mayor capacidad de AH160-Fe, que también está en línea con los resultados de biofortificación encontrados (**Figura 31**). Al igual que la EU, los valores de ERD en el suelo y FT del sistema se ajustan a este patrón de variación, evaluando así la eficiencia de cada uno de los bio-quelados de la siguiente manera: AH160-Fe > AH180-Fe > ASCG-Fe > AH200-Fe. Sin embargo, independientemente de la cantidad disponible de este micronutriente que se encuentra en el suelo (**Tabla 30**. Efectos sobre las propiedades del suelo de los bio-quelatos activados después de 40 días de cultivo.), el Fe remanente contenido en las partículas (no asimilable, **Tabla 31**) podría ser liberado al medio con el tiempo y tener un efecto residual en los próximos ciclos de cultivo dependiendo de la composición y tipo de suelo (Maqueda, et al., 2014). Además, vale la pena mencionar que todos los bio-quelatos, excepto el AH200-Fe, superan al control-Fe en términos de EU y ERD. Por otro lado, el FT es el mismo para AH160-Fe, AH180-Fe y control-Fe, que presentan los valores más altos entre los biofortificantes probados (0.07). Cervera-Mata et al. (2021a) reportaron un TF similar para melanoidinas SCG (Mel-Fe) y un TF ligeramente inferior para SCG-Fe (aprox. 0.05). Este parámetro es un buen indicador de la calidad del cultivo, especialmente por el problema de la inmovilización del Fe en suelos calcáreos (Maqueda, et al., 2014).

4.7.1.5. Aspectos nutricionales

Para tener una perspectiva complementaria del uso de bio-quelatos de SCG y sus hidrocarburos en la biofortificación de plantas, es necesario profundizar en los aspectos nutricionales que finalmente tendrán un impacto directo en la salud humana. La **Tabla 32** resume el aporte dietético de Fe por lechuga de cada tratamiento obtenido en este trabajo.

Tabla 32. Aporte dietético nutricional de Fe de las lechugas por tratamiento.

Tratamiento	Ingesta de Fe por porción* (mg/porción)	Contribución a la IDR** (%)	
		M	H
Control	0.110	0.614	1.381
Control-Fe	0.299	1.664	3.743
ASCG-Fe	0.207	1.147	2.581

AH160-Fe	0.305	1.692	3.806
AH180-Fe	0.285	1.584	3.565
AH200-Fe	0.156	0.867	1.950

IDR, ingesta diaria recomendada; M, mujeres; H, hombres. *Considerando un tamaño de porción de 1 taza triturada (35 g). **Considerando una IDR de 18 mg/d en mujeres y 8 mg/d en hombres a partir de los 19+ años.

Aunque la literatura informa un contenido estándar de Fe de 0.2 mg por porción de lechuga (NutritionValue.org, 2022), el contenido de micronutrientes puede variar según la variedad de la planta. Encontramos un contenido de Fe de 0.110 mg por porción para *Lactuca sativa* var. *longifolia*. Teniendo en cuenta un peso medio por ración de 35 g de lechuga (NutritionValue.org, 2022), se produce un claro aumento de la contribución de Fe a la ingesta diaria recomendada (IDR) para mujeres y hombres (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., 2022; NutritionValue.org, 2022) cuando la lechuga se cultiva con agentes biofortificantes (**Tabla 32**). El aporte por ración aumenta hasta 0.305 mg Fe en lechuga cultivada con bio-quelados frente a 0.110 mg Fe de lechuga convencional (control). Esto también se refleja directamente en la aportación de la IDR ya que todos los tratamientos consiguieron duplicar e incluso triplicar este porcentaje. El interés se basa en AH160-Fe y AH180-Fe ya que estos bio-quelatos no solo muestran la mayor contribución a la IDR sino que parecen comportarse igual que el quelato comercial (control-Fe), que triplica los valores del control. Este hecho podría ser de particular relevancia para la prevalencia de anemia ferropénica en la población mundial, especialmente en mujeres (33%) y niños (42%) (OMS, 2020).

Consideraciones finales

Los SCG y sus hidrochars activados son un material potencial para la biofortificación agronómica en dosis de 0.2%. Este estudio muestra que, especialmente AH160-Fe, tiene una capacidad de biofortificación similar a la de un quelato comercial; seguido de AH180-Fe, ASCG-Fe y finalmente AH200-Fe. Estos resultados se traducen en lechugas con tres veces más contenido de Fe que las lechugas convencionales, no biofortificadas, y, a su vez, en un aumento proporcional del porcentaje de la IDR en hombres y mujeres.

La eficiencia de biofortificación de estos bio-quelatos no está condicionada por su contenido total de Fe, sin embargo, podrían estar involucradas otras características de los bio-productos adquiridas después de la activación. Ninguno de los productos ensayados modificó las propiedades del suelo ni limitó el crecimiento de las plantas, pero sí movilizan y facilitan la absorción de elementos como el Mn y el Cu. Finalmente, la aplicación de estos bio-quelatos posiblemente podría mantener el estado de Fe disponible en el suelo para cultivos posteriores a través de la mineralización microbiana posterior.

4.7.2. Zn

Preámbulo

La deficiencia de Zn en los alimentos se debe principalmente a que los suelos tienen deficiencia de Zn (Prasad, et al., 2014). La biofortificación agronómica de Zn se ha convertido en una de las estrategias más prometedoras para abordar este inconveniente y los alimentos básicos son los cultivos objetivo más comunes (Praharaj, et al., 2021). La aplicación foliar de Zn es la técnica más ensayada para aumentar las concentraciones de Zn en el grano (Zou, et al., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que las hortalizas de hoja son cultivos aptos para la biofortificación mediante aplicación al suelo o solución nutritiva (Cinto de Moraes, et al., 2022).

Siguiendo con el mismo ensayo realizado previamente para el Fe (Ensayo 7), en esta última parte se expone lo encontrado con respecto al Zn para evaluar el potencial de biofortificación de los bio-quelatos de hidrochars de SCG activados. Se ha descartado el análisis de suelo debido al impacto nulo que tiene la dosis ensayada sobre sus propiedades, vista también en el Fe.

4.7.2.1. Efectos sobre la planta

El peso fresco de las hojas de lechuga osciló entre 29.6 y 25.3 g con los valores más altos ($p < 0.05$) alcanzados por las lechugas control (Peso fresco (PF) y peso seco (PS) de las lechugas después de 40 días de cultivo. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n = 4$). Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las columnas sin

ninguna letra no mostraron diferencias significativas. **Figura 33**). Sin embargo, las lechugas cultivadas con bio-quelatos activados obtuvieron pesos ligeramente inferiores a las muestras control (~4 g). Los únicos residuos que disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) el PF de las lechugas fueron SCGA-Zn y H200A-Zn, pero lo hacen levemente y solo con respecto a la muestra control. Estos resultados son muy positivos ya que no generan fuertes problemas de toxicidad en la planta, considerando los resultados anteriores obtenidos en los ensayos 5 y 6, y los de Cervera-Mata et al. (2019) y Hardgrove & Livesley (2016). Estas ligeras diferencias no fueron observables en su desarrollo morfológico puesto que el aspecto de las lechugas fue similar para todos los tratamientos (**Figura 32**).

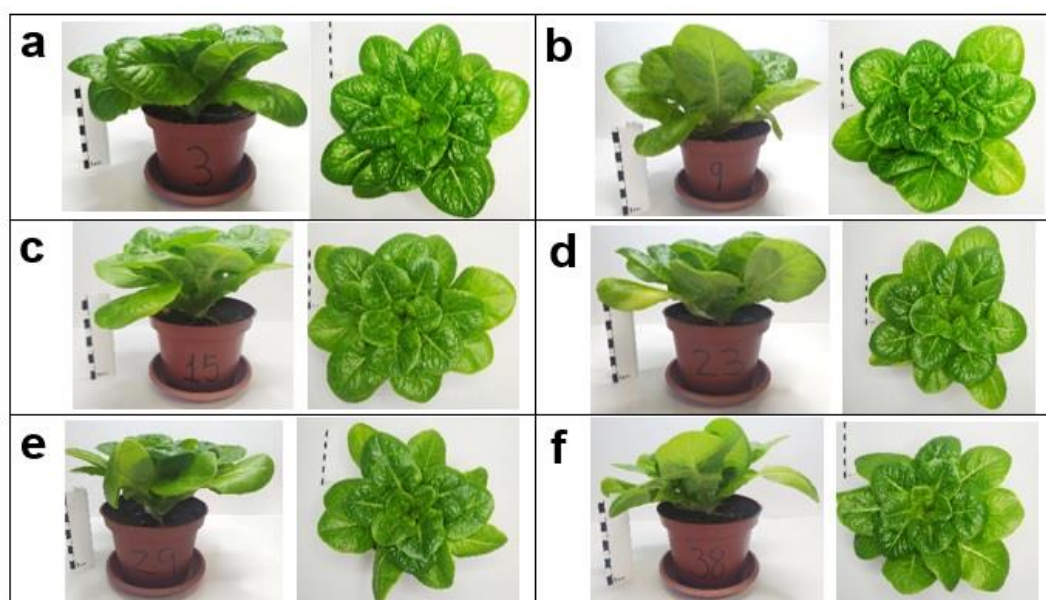


Figura 32. Imágenes (planos axial y cenital) de lechuga de cada tratamiento después de 40 días de cultivo. a) Control; b) Control-Zn; c) ASCG-Zn; d) AH160-Zn; e) AH180-Zn; f) AH200-Zn. Se seleccionó uno por tratamiento.

Al igual que en el ensayo con los bio-quelatos activados de Fe, el escaso efecto inhibitorio de los bio-quelatos activados de Zn podría estar relacionado con el descenso del contenido de polifenoles tanto en los SCG como en los hidrochars después de la activación (**Tabla 20**), así como con las bajas dosis de aplicación (0.2%). En cuanto al peso seco, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los distintos

tratamientos (**Figura 33**), lo cual no está de acuerdo con la tendencia a la disminución encontrada en los ensayos de esta tesis en lechugas cultivadas con la adición de SCG e hidrochars.

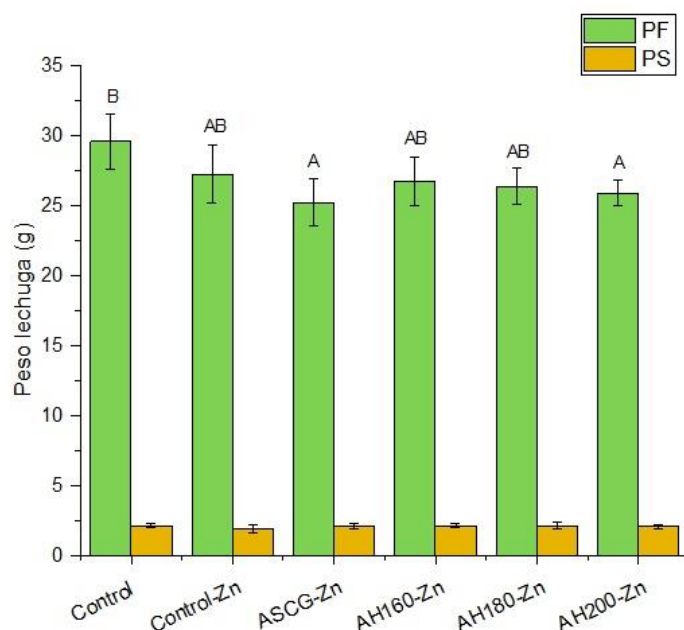


Figura 33. Peso fresco (PF) y peso seco (PS) de las lechugas después de 40 días de cultivo. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=4$). Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las columnas sin ninguna letra no mostraron diferencias significativas.

4.7.2.2. Biofortificación en zinc

En cuanto al contenido de Zn en las lechugas, la adición de bio-quelatos activados y funcionalizados incrementó significativamente ($p < 0.05$) este micronutriente con respecto a la muestra control (**Figura 34A**). En concreto, SCGA-Zn aumentó el contenido de Zn en un 168%, H160A-Zn en un 187%, H180A-Zn en un 229% y H200A-Zn en un 215%. Es claramente un proceso de biofortificación con Zn. Cervera-Mata et al. (2021a), quienes estudiaron la adición de SCG funcionalizados con Zn, pero no activados, reportaron una relación entre la cantidad de Zn absorbida por la planta (0.485 mg /100 g) y la cantidad de Zn añadida (89.61 mg Zn/kg) para el caso de SCG no activado de 0.005. En el presente estudio, la relación es mayor: 0.011. Por lo tanto, planteamos la

hipótesis de que la activación no solo parece tener un papel importante en la captura de más micronutrientes en el residuo, sino que también parece favorecer la liberación y la consiguiente absorción de micronutrientes por parte de la planta. Según la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA), el contenido medio de Zn en la lechuga es de 0.3 mg/100 g de porción comestible. En nuestro ensayo, se alcanzaron valores ligeramente superiores al valor medio con los productos activados y funcionalizados (**Figura 34A**). Asimismo, según Kaur & Garg (2021), el nivel óptimo de Zn requerido para un buen crecimiento de la mayoría de los cultivos está entre 30 y 200 mg Zn por kg de peso seco (PS). Los valores de Zn obtenidos en este estudio están en ese rango: 34 mg/kg PS con SCGA-Zn, 38 mg/kg PS con H160A-Zn, 42 mg/kg PS con H180A-Zn y 43 mg/kg PS con H200A-Zn. La muestra control estaría fuera de los valores dados por Kaur & Garg (2021), con 15 mg/kg PS. Por tanto, este resultado refuerza el carácter biofortificante de estos residuos.

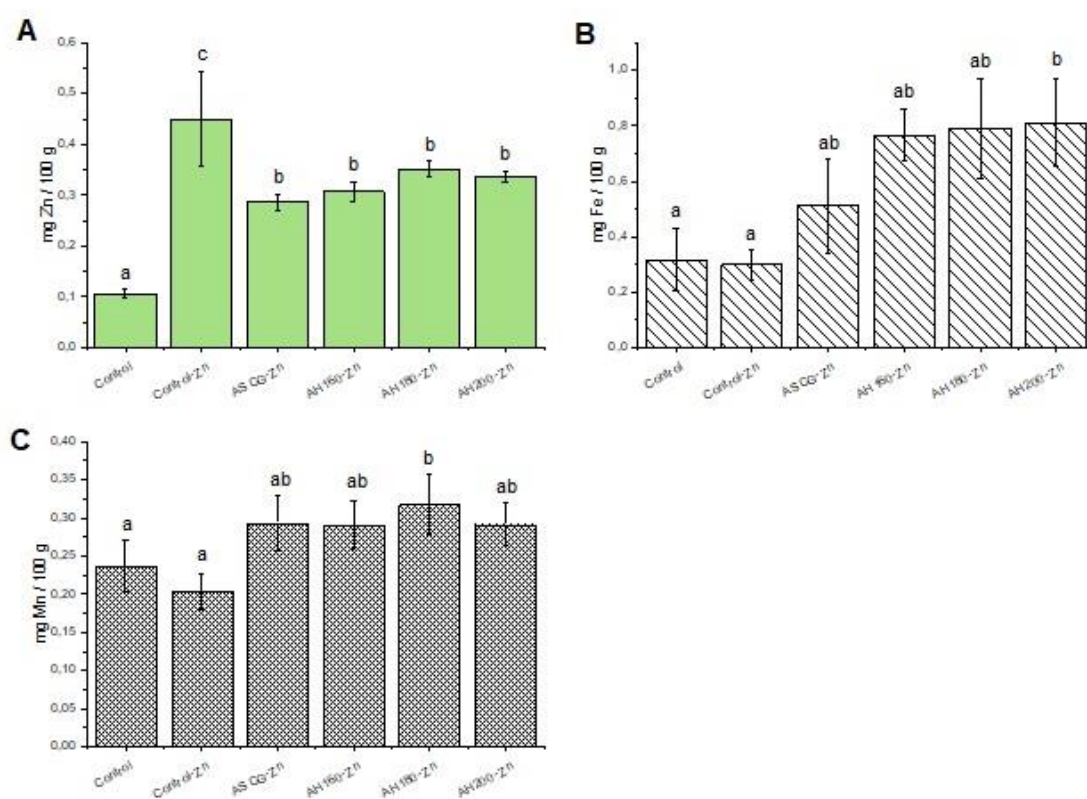


Figura 34. Contenido de A) Zn, B) Fe y C) Mn expresados en función del peso fresco de la parte comestible de la lechuga en los diferentes tratamientos. Las barras representan las desviaciones estándar de las medias ($n=4$). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, el tratamiento con el quelato comercial DTPA-Zn (control-Zn) produjo lechugas con mayor contenido de Zn, lo cual concuerda con los resultados de Cervera-Mata et al. (2021a). Kozik et al. (2011) agregaron otro quelato (DEDTA-Zn) para incrementar el Zn en hojas de lechuga y encontraron que a una concentración de 10 mg/kg se lograron alcanzar valores de 63 mg Zn/kg PS, valores similares a los encontrados en nuestro ensayo que son 74 mg Zn/kg. Por esta razón, el uso de quelatos es una de las herramientas más utilizadas para aumentar los micronutrientes en los cultivos (Cakmak & Kutman, 2018), pero tienen un efecto negativo en el suelo y las plantas: toxicidad y deterioro del balance de nutrientes (Mohammadi & Khoshgoftarmanesh, 2014).

4.7.2.3. Implicaciones sobre otros contenidos de micronutrientes

También son interesantes los resultados del contenido de Fe y Mn en la planta (**Figura 34B y C**, respectivamente). En el caso del Fe, la adición de todos los bio-productos incrementó significativamente ($p < 0.05$) este micronutriente, no solo con respecto al control, sino también con respecto al control-Zn. Las muestras que aumentan en mayor medida el contenido de Fe en la planta son los hidrochars, alcanzando un valor aproximado de 0.8 mg Fe/100 g. Estos valores están muy cerca de los valores reportados por la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA) para Fe en lechuga (1 mg/100 g porción comestible). En cuanto al contenido de Mn, en todos los tratamientos en los que se utilizó los bio-quelatos se evidenció un incremento de estos micronutrientes con respecto a los dos controles (**Figura 34C**), pero solo la adición de H180A-Zn lo hizo de manera significativa ($p < 0.05$). Según Li et al. (2019), el Mn es totalmente necesario a niveles bajos de 20-40 mg/kg PS. En nuestro ensayo, los valores de Mn obtenidos con la adición de los bio-quelados están entre 34 y 39 mg/kg PS, por lo que se encuentran en niveles adecuados para la planta. El efecto biofortificante sobre el

Fe y el Mn es independiente de la funcionalización y puede deberse al carácter movilizador o quelante de estos productos, tal y como se ha visto en ensayos anteriores (ensayo 5, 6 y 7.1) y como lo indican Rufián & de la Cueva (2009) y Cervera-Mata et al. (2019). Estos últimos autores vieron que la adición de SCG sin funcionalización y activación aumentaba los contenidos de V, Fe, Co y Mn en lechuga.

4.7.2.4. Aspectos nutricionales

De acuerdo con la **Tabla 33** y considerando un tamaño estándar de ración de referencia de 35 g de lechuga, las cultivadas con AH180-Zn aportan 0.123 mg de Zn, 0.086 mg más que las lechugas cultivadas sin bio-quelatos, que aportan tan solo 0.037 mg de Zn por ración. Este incremento no iguala el aporte que brinda la lechuga cultivada con un quelato comercial: 0.157 mg (**Tabla 33**), ni los reportados por Cervera-Mata et al. (2021a) cultivados con los bio-quelatos SCG-Zn: 0.1698 mg y Mel-Zn: 0.091 mg, recalculados para el mismo tamaño de porción utilizado en este análisis. Sin embargo, incluso las lechugas menos biofortificadas obtenidas en este estudio pueden casi triplicar la ingesta de Zn en comparación con las no biofortificadas.

Tabla 33. Aporte dietético nutricional de Zn de las lechugas por tratamiento.

Tratamiento	Ingesta de Zn por porción* (mg/porción)	Contribución a la IDR** (%)	
		M	H
Control	0.037	0.467	0.339
Control-Zn	0.157	1.965	1.429
ASCG-Zn	0.100	1.252	0.911
AH160-Zn	0.107	1.343	0.977
AH180-Zn	0.123	1.537	1.118
AH200-Zn	0.118	1.471	1.070

IDR, ingesta diaria recomendada; M, mujeres; H, hombres. *Considerando un tamaño de porción de 1 taza triturada (35 g). **Considerando una IDR de 8 mg/d en mujeres y 11 mg/d en hombres a partir de los 19+ años.

Teniendo en cuenta RDI de 8 mg/d en mujeres y 11 mg/d en hombres para mayores de 19 años (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., 2022), el aumento del contenido de Zn en la lechuga cultivada con AH180-Zn también representa un aumento

del 229.1% de la IDR en mujeres y del 139.4% en hombres respecto a la lechuga no biofortificada.

Consideraciones finales

La adición de SCG e hidrochars activados y funcionalizados a diferentes temperaturas en dosis de 0.2% en el suelo incrementa los contenidos de Zn hasta 3 veces en las hojas de lechuga con respecto a las muestras control. Existe una clara biofortificación que se ve reflejada finalmente en el aporte nutricional en la misma proporción. Aunque no de manera significativa, parece que los hidrochars tienen un mayor efecto sobre los incrementos de Zn que los SCG, especialmente AH180-Zn. Como efecto adicional, también se ha encontrado que estos productos activados y funcionalizados aumentan el contenido de otros micronutrientes como Fe y Mn. Todos estos resultados revelan un importante avance en el equilibrio entre biofortificación y ausencia de fitotoxicidad para el uso de los hidrochars de SCG con fines agronómicos.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de los diferentes ensayos realizados para alcanzar los objetivos planteados en esta tesis doctoral se presentan a continuación:

1. La carbonización hidrotermal de los SCG genera hidrochars con propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas diferentes. La temperatura, mas no la presión, es el parámetro que gobierna el proceso y determina las características del hidrochar resultante. En general, los hidrochars tienen menor pH, conductividad eléctrica, contenido de P y K asimilables, materia volátil, cenizas, humedad y tamaño de partícula; por el contrario, tienen mayor contenido de carbono fijado, polifenoles totales, superficie específica y relación C/N. Estos parámetros se acentúan conforme aumenta la temperatura.
2. A pesar de que no existen diferencias marcadas en las propiedades de un hidrochar sobre otro en vista de una aplicación en el campo agronómico, el hidrochar obtenido a 160 °C, en comparación con sus homólogos a 180 y 200 °C, puede ser más apto debido a su relativa más baja toxicidad y a que su estructura se ve mejor conservada después de la carbonización, lo que aportaría mayor dinamismo en el microcosmos del suelo. Además, es el producto con mayor rendimiento.
3. Los licores generados de la carbonización hidrotermal de los SCG son productos muy ricos en azúcares reductores, pero también en compuestos tóxicos como furfurales, hidroximetilfurfurales (HMF), compuestos fenólicos y ácidos orgánicos, especialmente ácido acético. El licor obtenido a 160 °C es el que más potencial de revalorización presenta como sustrato de fermentación. Su alto contenido en azúcares, sin una excesiva cantidad de compuestos tóxicos, brinda más posibilidades de uso. Se necesitan más estudios para evaluar procesos de detoxificación o, en el mismo sentido, obtención de compuestos de alto valor biológico.
4. Ninguno de los pretratamientos, desgrasado o lavado, estudiados para la detoxificación de los hidrochars de SCG tuvo un impacto relevante en la mejora de las características morfológicas de las partículas o en la disminución de la toxicidad para el uso de estos bio-productos en el suelo. Dichos procesos podrían aplicarse dentro de un concepto de biorrefinería para la obtención de productos de alto valor biológico, según convenga, pero no como procesos de detoxificación.

5. Los hidrochars de SCG utilizados como enmienda orgánica de suelos tienen un efecto similar a los SCG, pero con mayor poder fitotóxico y capacidad para movilizar elementos minerales, lo que los hace susceptibles de ser utilizados en pequeñas dosis (<1%). No modifican significativamente las propiedades fisicoquímicas del suelo, pero aportan formas de carbono más estable.
6. Los hidrochars de SCG tras ser funcionalizados con sales de Fe y Zn actúan como bio-quelatos agrícolas, sin embargo, la temperatura de HTC afecta la retención de los minerales en su estructura. La aplicación al suelo en dosis de 0.5% provocan un aumento del contenido de estos micronutrientes en lechugas (biofortificación) aunque con todavía con leves limitaciones en el crecimiento de las plantas por su conocida fitotoxicidad.
7. La eficiencia de adsorción, así como la afinidad al Zn y al Fe, se ven mejoradas con la activación química (NaOH) de los hidrochars previo a su funcionalización. Los mecanismos que influyen en esta mejora se desconocen, aunque se ha visto que no recaen en el grado de porosidad o el contenido de polifenoles totales de los bio-productos. Estudios más profundos son necesarios para comprender estas interacciones.
8. Los bio-quelatos de SCG activados y funcionalizados con Fe y Zn son eficaces para la biofortificación agronómica in vitro. Las lechugas cultivadas con estos bio-productos incrementan hasta 3 veces el contenido de estos micronutrientes en comparación con lechugas cultivadas de manera convencional (control). Una dosis subtóxica de 0.2% en el suelo suprime los efectos tóxicos sin afectar la cantidad de micronutriente suministrada por el bio-quelato, además de dejar una reserva mineral importante en el suelo que puede seguir suministrando micronutrientes a los próximos ciclos de cultivo.

Para finalizar, es fundamental resaltar que para todas las aplicaciones exploradas en el campo agronómico en esta tesis doctoral para los hidrochars de SCG, así como para la futura revalorización de los licores en base a los estudios preliminares de composición realizados, la temperatura de carbonización hidrotermal que más opciones brindaría para el aprovechamiento íntegro de este residuo sería la de **160 °C**. Sin embargo, la

revalorización de los posos de café mediante carbonización hidrotermal en una cascada de procesos aún es limitado. La culminación de este trabajo deja abierta una nueva puerta para alcanzar el desarrollo y/o perfeccionamiento de otros procesos que permitan alcanzar la economía circular y asegurar la sostenibilidad ambiental y económica.

Un sistema interconectado compuesto por productores, distribuidores y también consumidores, junto con gobiernos y organizaciones, empresarios e investigadores es imprescindible para lograr una verdadera economía circular.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul Manaf, S. F., Jahim, J. M., Harun, S. & Indera Luthfi, A. A., 2018. Fractionation of oil palm fronds (OPF) hemicellulose using dilute nitric acid for fermentative production of xylitol. *Industrial Crops & Products* 115, 6–15.
- Adan-Mas, A., Alcaraz, L., Arévalo-Cid, P., López-Gómez, F.A., Montemor, F., 2021. Coffee-derived activated carbon from second biowaste for supercapacitor applications. *Waste Management* 120, 280–289. doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.11.043>
- Adriano, D. C., 2001. *Trace elements in Terrestrial Environments*. 2 ed. Nuew York:Springer.
- AECafé, 2021. *Informe del sector del café en España*.
- Afolabi, O., Sohail, M. & Cheng, Y.-L., 2020. Optimisation and characterisation of hydrochar production from spent coffee grounds by hydrothermal carbonisation. *Renewable Energy* 147, 1380-1391.
- Alcaraz, L., Escudero, M. E., Alguacil, F. J., Llorente, I., Urbieto, A., Fernández, P., López, F. A., 2019. Dysprosium removal from water using active carbons obtained from spent coffee ground. *Nanomaterials* 9, 1372.
- Almendros, P., Gonzalez, D. & Alvarez, J. M., 2013. Long-term bioavailability effects of synthesized zinc chelates fertilizers on the yield and quality of a flax (*Linum usitatissimum* L.) crop. *Plant And Soil* 368, 251–265.
- Alves, R. C., Rodrigues, F., Nunes, M. A., Vinha, A. F., Oliveira, M. B., 2017. State of the art in coffee processing by-products. In: *Handbook of Coffee Processing By-Products*. Chania:Academic Press, 1–26.
- Arabo, 2021. *Café Arabo*. [Online] Available at: <https://cafe-arabo.com/etapas-proceso-produccion-cafe/> [Accessed 31 01 2023].
- Aristizábal-Marulanda, V., Chacón-Pérez, Y., Cardona-Alzate, C. A., 2017. Coffee Processing By-Products. In: *Handbook of Coffee Processing By-Products*. Chania: Academic Press, 63-92.
- Asano, I., Hamauchi, K., Fujii, S., Iino, H., 2003. In Vitro Digestibility and Fermentation of Mannooligosaccharides from Coffee Mannan. *Food Science and Technology Research* 1(9), 62–66.

- Atelge, M. R. et al., 2021. Anaerobic co-digestion of oil-extracted spent coffee grounds with various wastes: Experimental and kinetic modeling studies. *Bioresource Technology* 322, 124470.
- Ballesteros, L. F., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A. & Mussatto, S. I., 2015. Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment. *Carbohydrate Polymers* 127, 347–354.
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., Mussatto, S. I., 2017. Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Journal of Food Engineering* 199, 1-8.
- Ballesteros, L. F., Texeira, J. A., Mussatto, S. I., 2014. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology* 7, 3493–3503.
- Barbanera, M. & Muguerza, I. F., 2020. Effect of the temperature on the spent coffee grounds torrefaction process in a continuous pilot-scale reactor. *Fuel* 262, 116493.
- Bargmann, I., Rillig, M. C., Buss, W., Kruse, A., Kuecke, M., 2013. Hydrochar and Biochar Effects on Germination of Spring Barley. *Journal of Agronomy and Crop Science* 199(5), 309-383.
- Bargmann, I. Rillig, M. C., W., Kruse, A., Greef, J. M., Kuecke, M., 2014. Effects of hydrochar application on the dynamics of soluble nitrogen in soils and on plant availability. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 177, 48-58.
- Baronti, S., Alberti, G., Camin, F., Criscuoli, I., Genesio, L., Mass, L., Vaccari, F. P., Ziller, L., Miglietta, F., 2017. Hydrochar enhances growth of poplar for bioenergy while marginally contributing to direct soil carbon sequestration. *GCB Bioenergy* 9(11), 1618–1626.
- Burniol Figols, A., Cenian, K., Skiadas, I. V. & Gavala, H. N., 2016. Integration of chlorogenic acid recovery and bioethanol production from spent coffee grounds. *Biochemical Engineering Journal* 116, 54–64.

- Cakmak, I. & Kutman, U., 2018. Agronomic biofortification of cereals with zinc: A review. *European Journal of Soil Science* 69, 172-180.
- Caliskan, S., Ozok, N. & Makineci, E., 2020. Utilization of Spent Coffee Grounds as Media for Stone Pine (*Pinus pinea*) Seedlings. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 20, 2014–2024.
- Campos de Bomfim, A. S., Magalhães de Oliveira, D., Cornelis Voorwald, H. J., Coelho de Carvalho Benini, K. C., Dumont, M. J., Rodrigue, D., 2022. Valorization of Spent Coffee Grounds as Precursors for Biopolymers and Composite Production. *Polymers* 14, 437.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H. A. & Oomah, B. D., 2015. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology* 45, 24-36.
- Cao, X., Ro, K. S., Chappell, M., Li, Y., Mao, J., 2011. Chemical structures of swine-manure chars produced under different carbonization conditions investigated by advanced solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Energy Fuels* 25, 388–397.
- Castro, C. S., Abreu, A. L., Silva, C. L. T. & Guerreiro, M. C., 2011. Phenol adsorption by activated carbon produced from spent coffee grounds. *Water Science & Technology* 10(64), 2059-2065.
- Cavali, M., Livardi Junior, L., Dutra de Sena, J., Woiciechowski, A. L., Soccol, C. R., Belli Filho, P., Bayard, R., Benbelkacem, H., Borges de Castilhos Junior, A., 2023. A review on hydrothermal carbonization of potential biomass wastes, characterization and environmental applications of hydrochar, and biorefinery perspectives of the process. *Science of The Total Environment* 857(20), 159627.
- Ceglie, F. G., Bustamante, M. A., Amara, M. B. & Tittarelli, F., 2015. The challenge of peat substitution in organic seedling production: Optimization of growing media formulation through mixture design and response surface analysis. *PLoS ONE* 10(6), 1-14.

Cerrada Romero, C., 2017. *Efecto prebiótico de mano-oligosacáridos extraídos de posos de café en la microbiota intestinal humana*, Trabajo final de máster, Universidad de Granada.

Cervera-Mata, A., Pastoriza, S., Rufián-Henares, J. A., Párraga, J., Martín-García, J. M., Delgado, G., 2018. Impact of spent coffee grounds as organic amendment on soil fertility and lettuce growth in two Mediterranean agricultural soils. *Archives of Agronomy and Soil Science* 64, 790–804.

Cervera-Mata, A., Navarro-Alarcón, M., Delgado, G., Pastoriza, S., Montilla-Gómez, J., Llopis, J., Sánchez-González, C., Rufián-Henares, J. A., 2019a. Spent coffee grounds improve the nutritional value in elements of lettuce (*lactuca sativa* L.) and are an ecological alternative to inorganic fertilizers. *Food Chemistry* 282, 1-8.

Cervera-Mata, A., Martín-García, J. M., Delgado, R., Párraga, J., Sánchez-Marañón, M., Delgado, G., 2019b. Short-term effects of spent coffee grounds on the physical properties of two Mediterranean agricultural soils. *International Agrophysics* 33, 205-216.

Cervera-Mata, A., Aranda, V., Ontiveros-Ortega, A., Comino, F., Martín-García, J. M., Vela-Cano, M., Delgado, G., 2020a. Hydrophobicity and surface free energy to assess spent coffee grounds as soil amendment. Relationships with soil quality. *Catena* 196, 104826.

Cervera-Mata, A., Navarro-Alarcón, M., Rufián-Henares, J. A., Pastoriza, S., Montilla-Gómez, J., Delgado, G., 2020b. Phytotoxicity and chelating capacity of spent coffee grounds: Two contrasting faces in its use as soil organic amendment. *Science of the Total Environment* 717, 137247.

Cervera-Mata, A., Fernández-Arteaga, A., Navarro-Alarcón, M., Hinojosa, D., Pastoriza, S., Delgado, G., Rufián-Henares, J. A., 2021a. Spent coffee grounds as a source of smart biochelates to increase Fe and Zn levels in lettuces. *Journal of Cleaner Production* 328, 129548.

Cervera-Mata, A., Lara, L., Fernández-Arteaga, A., Rufián-Henares, J.A., Delgado, G., 2021b. Washed hydrochar from spent coffee grounds: A second generation of coffee residues. Evaluation as organic amendment.. *Waste Management* 120, 322-329.

- Cervera-Mata, A., Delgado, G., Fernández-Arteaga, A., Fornasier, F., Mondini, C., 2022. Spent coffee grounds by-products and their influence on soil C–N dynamics. *Journal of Environmental Management* 302, 114075.
- Chan, H. Shi, C., Wu, Z., Sun, S., Zhang, S., Yu, Z., He, M., Chen, G., Wan, X., Tian, J., 2022. Superhydrophilic three-dimensional porous spent coffee ground reduced palladium nanoparticles for efficient catalytic reduction. *Journal of Colloid and Interface Science* 608, 1414–1421.
- Charmas, B., Zięzio, M., Tomaszewski, W. & Kucio, K., 2022. Smart preparation of microporous carbons from spent coffee grounds. Comprehensive characterization and application in explosives removal from water samples.. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 645, 128889.
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Regolo, L., Alvarez-Suarez, J. M., Navarro-Hortal, M. D., Xiao, J., Quiles, J. L., Battino, M., Giampieri, F., 2022. The reciprocal interaction between polyphenols and other dietary compounds: Impact on bioavailability, antioxidant capacity and other physico-chemical and nutritional parameters. *Food Chemistry* 375, 131904.
- Cinto de Moraes, C.,Silveira, N. M., Mattar, G. S., Sala, F. C., Vicari Mellis, E., Stefanini, G., Villani Purquerio, L. F., 2022. Agronomic biofortification of lettuce with zinc under tropical conditions: Zinc content, biomass production and oxidative stress. *Scientia Horticulturae* 303, 111218.
- Coffenza, C., 2019. *Cafés Coffenza*. [Online] Available at: <http://www.cafescoffenza.com/el-proceso-de-tostado-o-tueste-del-cafe>
- Colombo, C., Palumbo, G., He, J. Z., Pinton, R., Cesco, S., 2014. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments* 14. 538–548.
- Colucci Cante, R., Garella, I., Gallo, M. & Nigro, R., 2021. Effect of moisture content on the extraction rate of coffee oil from spent coffee grounds using Norflurane as solvent. *Chemical Engineering Research and Design* 165, 172–179.

- Comino, F., Cervera-Mata, A., Aranda, V., Martín-García, J. M., Delgado, G., 2019. Short-term impact of spent coffee grounds over soil organic matter composition and stability in two contrasted Mediterranean agricultural soils. *Journal of Soils and Sediments* 20, 1182–1198.
- Cortes Ortiz, W. G., 2014. Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos. *Revista de Tecnología*, 13(1), 39-44.
- Cruz, R., Morais, S., Mendes, E., Pereira, J. A., Baptista, P., Casal, S., 2014. Improvement of vegetables elemental quality by espresso coffee residues. *Food Chemistry* 148, 294–299.
- Cruz, R., Mendes, E., Torrinha, A., Morais, S., Pereira, J. A., Baptista, P., Casalet, S., 2015. Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach. *Food Research International* 73, 190–196.
- Cruz, S. & Dos Santos Cordovil, C. S. M., 2015. Espresso coffee residues as a nitrogen amendment for small-scale vegetable production. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(1), 3059–3066.
- Dhaliwal, S. S., Dhaliwal, S. S., Sharma, V., Shukla, A. K., Verma, V., Kaur, M., Shivay, Y. S., Nisar, S., Gaber, A., Brestic, M., Barek, V., Skalicky, M., Ondrisik, P., Hossain, A., 2022. Biofortification—A Frontier Novel Approach to Enrich Micronutrients in Field Crops to Encounter the Nutritional Security. *Molecules* 27, 1340.
- Dieguez-Alonso, A., Funke, A., Anca-Couce, A., Rombolà, A. G., Ojeda, G., Bachmann, J., Behrendt, F., 2018. Towards Biochar and Hydrochar Engineering—Influence of Process Conditions on Surface Physical and Chemical Properties, Thermal Stability, Nutrient Availability, Toxicity and Wettability. *Energies* 3(11), 496.
- EcoInnovación, 2021. *Valorización de residuos agroalimentarios*.
- Elmore, J. R., Dexter, G. N., Salvachúa, D., O'Brien, M., Klingeman, D. M., Gorday, K., Michener, J. K., Peterson, D. J., Beckham, G. T., Guss, A. M., 2020. Engineered *Pseudomonas putida* simultaneously catabolizes five major components of corn stover lignocellulose: Glucose, xylose, arabinose, p-coumaric acid, and acetic acid. *Metabolic Engineering* 62, 62–71.

- Elrashidi, M, Alva, A. K., Huang, Y. F., Calvert, D. V., Obreza, T. A., He, Z. L., 2001. Accumulation and downward transport of phosphorus in Florida soils and relationship to water quality. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32, 3099–3119.
- Fernandez-Bayo, J. D., Yazdani, R., Simmons, C. W. & VanderGheynst, J. S., 2018. Comparison of thermophilic anaerobic and aerobic treatment processes for stabilization of green and food wastes and production of soil amendments. *Waste Management* 77, 555–564.
- Ferreira, A. M., Gomes, H. M. D., Coutinho, J. A. O. & Freire, M. G., 2021. Valorization of Spent Coffee by Caffeine Extraction Using Aqueous Solutions of Cholinium-Based Ionic Liquids. *Sustainability* 13(13), 7509.
- Fregolente, L. G., Dos Santos, J. V., Vinci, G., Piccolo, A., Moreira, A. B., Ferreira, O. P., Bisinoti, M. C., Spaccini, R., 2021. Insights on Molecular Characteristics of Hydrochars by ¹³C-NMR and Off-Line TMAH-GC/MS and Assessment of Their Potential Use as Plant Growth Promoters. *Molecules* 26, 1026.
- Fuertes, A. B., Camps Arbestain, M., Sevilla, M., Maciá-Agulló, J. A., Fiol, S., López, R., Smernik, R. J., Aitkenhead, W. P., Arce, F., Macias, F., 2010. Chemical and structural properties of carbonaceous products obtained by pyrolysis and hydrothermal carbonisation of corn stover. *Australian Journal of Soil Research* 48, 618–626.
- Galanakis, C., 2017. *Handbook of Coffee Processing By-Products*. Chania, Greece: Academic Press.
- Gemechu, F. G., 2020. Embracing nutritional qualities, biological activities and technological properties of coffee byproducts in functional food formulation. *Trends in Food Science & Technology*. 235–261.
- Global Hunger Index, 2014. *International Food Policy Research Institute (IFPRI)*. [En línea] Available at: <https://www.ifpri.org/sites/default/files/ghi/2014/index.html>
- Godos, J., Pluchinotta, F. R., Marventano, S., Buscemi, S., Li Volti, G., Galvano, F., Grosso, G., 2014. Coffee components and cardiovascular risk: beneficial and detrimental effects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 65(8). 925-936.

Gomes, T., Pereira, J. A., Ramalhosa, E., Casal, S., Baptista, P., 2013. Effect of fresh and composted spent coffee grounds on lettuce growth, photosynthetic pigments and mineral composition. *VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas*. Madrid, Spain, pp.1–5.

Gregory, P. J., Wahbi, A., Adu-Gyamfi, J., Heiling, M., Gruber, R., Joy, E. J., Broadley, M. R., 2017. Approaches to reduce zinc and iron deficits in food systems. *Global Food Security* 15, 1–10.

Gulcin, I. & Alwasel, S. H., 2022. Metal Ions, Metal Chelators and Metal Chelating Assay as Antioxidant Method. *Processes* 10(132).

Han Chiu, Y. & Yin Lin, L., 2019. Effect of activating agents for producing activated carbon using a facile one-step synthesis with waste coffee grounds for symmetric supercapacitors. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 101, 177–185.

Hardgrove, S. J. & Livesley, S. J., 2016. Applying spent coffee grounds directly to urban agriculture soils greatly reduces plant growth. *Urban Forestry and Urban Greening* 18, 1–8.

Haro García, A., 2019. *Puleva*. [Online] Available at: <https://www.lechepuleva.es/aprende-a-cuidarte/tu-alimentacion-de-la-a-z/c/cafe>

Hernández-Soto, M. C., Hernández-Latorre, M., Oliver-Tomas, B., Ponce, E., Renz, M., 2019. Transformation of Organic Household Leftovers into a Peat Substitute. *Journal of Visualized Experiments* 149.

Hijosa-Valsero, M., Garita-Cambronero, J., Paniagua-García, A. I. & Díez-Antolínez, R., 2019. Tomato Waste from Processing Industries as a Feedstock for Biofuel Production. *BioEnergy Research* 12, 1000–1011.

Hu, J.-L. y otros, 2012. Cadmium adsorption characteristic of alkali modified sewage sludge. *Bioresource Technology* 121, 25–30.

Hu, J.-L., He, X. W., Wang, C. R., Li, J. W., Zhang, C. H., 2012. Cadmium adsorption characteristic of alkali modified sewage sludge. *Bioresource Technology* 121, 25–30.

ICO, 2019. *Coffee Market Report*.

ICO, 2021. *Statista*. [Online] Available at: <https://es.statista.com/estadisticas/600964/consumo-global-de-cafe-2009/> [Accessed: 31 01 2023].

INE, 2020. *Instituto Nacional de Estadística*. [Online] Available at: <https://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?tpx=30628> [Accessed: 06 02 2023].

International Coffee Organization, 2019. *Coffee Market Report*.

Iriondo DeHond, A., Aparicio García, N., Fernandez-Gomez, B., Guisantes-Batan, E., Velázquez Escobar, F., Blanch, G. P., San Andres, M. I., Sanchez-Fortun, S., del Castillo, M. D., 2019. Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 51, 194 – 204.

Janissen, B. & Huynh, T., 2018. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources, Conservation & Recycling*, 110-117.

Jellali, S., Zorpas, A. A., Alhashmi, S. & Jeguirim, M., 2022. Recent Advances in Hydrothermal Carbonization of Sewage Sludge. *Energies* 15, 6714.

Kasongo, R., Verdoodt, A., Kanyankogote, P., Baert, G., Van Ranst, E., 2013. Response of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) to coffee waste application on a humid tropical sandy soil. *Soil Use and Management* 29, 22-29.

Kaur, H. & Garg, N., 2021. Zinc toxicity in plants: a review. *Planta*, 253(219).

Kim, D., Lee, K., Bae, D. & Park, K. Y., 2017. Characterizations of biochar from hydrothermal carbonization of exhausted coffee residue. *Journal of Material Cycles Waste Management*, 1036-1043.

Kim, E.-J., Seo, D. & Choi, K.-Y., 2020. Bioalcohol production from spent coffee grounds and okara waste biomass by engineered *Bacillus subtilis*. *Biomass Conversion and Biorefinery* 10, 167–173.

Kim, J. W., Jang, J. H., Yeo, H. J., Seol, J., Kim, S. R, Jung, Y. H., 2019. Lactic Acid Production from a Whole Slurry of Acid-Pretreated Spent Coffee Grounds by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* volume, Volume 189, p. 206–216.

Koç, E. & Karayığit, B., 2022. Assessment of Biofortification Approaches Used to Improve Micronutrient-Dense Plants That Are a Sustainable Solution to Combat Hidden Hunger. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 22, 475–500.

Kovalcik, A., Kucerab, D., Matouskovab, P., Pernicovab, I., Obrucab, S., Kalinab, M., Enevb, V., Marova, I., 2018. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6, 3495–3501.

Kozik, E., Tyksiński, W. & Bosiacki, M., 2011. A comparison of the efficiency of organic and mineral iron compounds in the greenhouse cultivation of lettuce. *Journal of Elementology*, 59–68.

Law, X. N., Cheah, W.Y., Chew, K.W., Ibrahim, M.F., Park, Y.-K., Ho, S.-H., Show, P.L., 2022. Microalgal-based biochar in wastewater remediation: Its synthesis, characterization and applications. *Environmental Research* 69, 26–30.

Leifa, F., Pandey, A. & Soccol, C. R., 2000. Solid state cultivation – an efficient method to use toxic agro-industrial residues. *Journal of Basic Microbiology*, 187–197.

Lenntech BV, 2019. *Lenntech*. [Online] Available at: <https://www.lenntech.com/periodic/water/potassium/potassium-and-water.htm>

Leonel, L. V., Sene, L., da Cunha, M. A. A., França Dalanhhol, K. C., de Almeida Felipe, M. G., 2020. Valorization of apple pomace using bio-based technology for the production of xylitol and 2G ethanol. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 43, 2153–2163.

Levenson, C. W. & Morris, D., 2011. Zinc and Neurogenesis: Making new neurons from development to adulthood. *Advances in Nutrition*, 96–100.

Libra, J. A., Ro, K. S., Kammann, C., Funke, A., Berge, N. D., Neubauer, Y., Titirici, M. M., Fühner, C., Bens, O., Kern, J., Emmerich, K. H., 2011. Hydrothermal carbonization of biomass residuals: A comparative review of the chemistry, processes and applications of wet and dry pyrolysis. *Biofuels* 1(2), 89–124.

- Li, J., Jia, Y., Dong, R., Huang, R., Liu, P., Li, X., Wang, Z., Liu, G., Chen, Z., 2019. Advances in the Mechanisms of Plant Tolerance to Manganese Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 5096.
- Limousny, L., Jeguirim, M. & Labaki, M., 2017. Energy applications of coffee processing by-products. In: *Handbook of Coffee Processing By-Products*. Chania: Elsevier, pp. 323-367.
- Liu, K. & Price, G. W., 2011. Evaluation of three composting systems for the management of spent coffee grounds. *Bioresource Technology*, 7966–7974.
- López, J. C., 2020. AINIA. [Online]Available at: <https://www.ainia.es/ainia-news/biorrefinerias-apuesta-firme-bioeconomia-circular/> [Accessed: 06 02 2023].
- Lowe, N. M., 2021. The global challenge of hidden hunger: perspectives from the field. *Proceedings of the Nutrition Society* 80, 283–289.
- Lucian, M. & Fiori, L., 2017. Hydrothermal Carbonization of Waste Biomass: Process Design, Modeling, Energy Efficiency and Cost Analysis. *Energies* 10, 211.
- Maass, D., Moya Ramírez, I., García Román, M., Jurado Alameda, E., Ulson de Souza, A. A., Borges Valle, J. A., Altmajer Vaz, D., 2016. Two-phase olive mill waste (alpeorujo) as carbon source for biosurfactant production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 91 (7), 1990–1997.
- Manals-Cutiño, E. M., Salas-Tort, D. & Penedo-Medina, M., 2018. Caracterización de la biomasa vegetal cascarilla de café. *Tecnología Química*, 38(1).
- Maqueda Porras, C., Morillo González, E., López Núñez, R., Undabeytia López, T., Cabrera, F., 2014. Influence of organic amendments on Fe, Cu, Mn, and Zn availability and clay minerals of different soils. *Archives of Agronomy and Soil Science* 61(5), 599–613.
- Massaya, J., Mills-Lampsey, B. & Chuck, C. J., 2022. Soil Amendments and Biostimulants from the Hydrothermal Processing of Spent Coffee Grounds. *Waste and Biomass Valorization* 13, 2889–2904.
- Mayanga-Torres, P. C., Lachos-Perez, D., Rezende, C. A., Prado, J. M., Ma, Z., Tompsett, G. T., Timko, M.T., Forster-Carneiro, T., 2017. Valorization of coffee industry residues by

- subcritical water hydrolysis: Recovery of sugars and phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids* 120, 75-85.
- McGee, E. J. T. & Diosady, L. L., 2018. Prevention of iron-polyphenol complex formation by chelation in black tea. *LWT - Food Science and Technology* 89, 756–762.
- McNutt, J. & He, Q. S., 2019. Spent coffee grounds: A review on current utilization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 71, 78–88.
- Mohammadi, P. & Khoshgoftarmanesh, A. H., 2014. The effectiveness of synthetic zinc(Zn)-amino chelates in supplying Zn and alleviating salt-induced damages on hydroponically grown lettuce. *Scientia horticulturae*, 117–123.
- Monente, C., Ludwig, I. A., Irigoyen, A., De Peña, M. P., Cid, C., 2015. Assessment of Total (Free and Bound) Phenolic Compounds in Spent Coffee Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(17), 327–4334.
- Morikawa, C. K. & Saigusa, M., 2008. Recycling coffee and tea wastes to increase plant available Fe in alkaline soils. *Plant Soil*, 249–255.
- Murthy, P. & Naidu, M., 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Recursos, Conservación y Reciclaje*, 45-58.
- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P. A., Roberto, I. C., Teixeira, J. A., 2011. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers* 83, 368–374.
- Navarro García, S. & Navarro García, G., 2013. *Química Agrícola: química del suelo y de los nutrientes esenciales para las plantas*. 3 ed. Madrid: Mundi-Prensa.
- Navia, D., Velasco, R. & Hoyos, J., 2011. Production and evaluation of ethanol from coffee processing by-products. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 287-294.
- Ning, S. & Zeller, M. P., 2019. Management of iron deficiency. *American society of Hematology*, 315-322.

- Obruca, S., Benesova, P., Petrik, S., Oborna, J., Prikryl, R., Marova, I., 2014. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry* 49, 1409–1414.
- Obruca, S., Obruca, S., Benesova, P., Kucera, D., Petrik, S., Marova, I., 2015. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology* 32(6), 569-574.
- Pal, V., Singh, G. & Singh Dhaliwal, S., 2021. A New Approach in Agronomic Biofortification for Improving Zinc and Iron Content in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Grain with Simultaneous Foliar Application of Zinc Sulphate, Ferrous Sulphate and Urea. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 21, 883–896.
- Panusa, A., Zuorro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., Petrucci, R., 2013. Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(17), 4162–4168.
- Paradowska, K., Zielinska, A., Kuras, M. & Wawer, I., 2017. The composition of bee pollen color fractions evaluated by solid-state ¹H and ¹³C NMR: their macroelement content and antioxidant properties. *Journal of Apicultural Research* 56(5), 523–532.
- Parlamento Europeo, 2018. *European Parliamentary Research Service*. [Online] Available at: <https://www.europarl.europa.eu/thinktank/infographics/circulareconomy/public/index.html> [Accessed 03 02 2023].
- Passos, C. P. & Coimbra, M. A., 2013. Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers* 94, 626–633.
- Patel, P., Trivedi, G. & Saraf, M., 2018. Iron biofortification in mungbean using siderophore producing plant growth promoting bacteria. *Environmental Sustainability*, 357–365.
- Pérez-Burillo, S., Pastoriza, S., Fernández-Arteaga, A., Luzón, G., Jiménez-Hernández, N., D'Auria, G., Francino, M. P., Rufián-Henares, J. A., 2019. Spent Coffee Grounds Extract, Rich in Mannooligosaccharides, Promotes a Healthier Gut Microbial

Community in a Dose-Dependent Manner. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67, 2500 - 2509.

Pérez-Burillo, S., Cervera-Mata, A., Fernández-Arteaga, A., Pastoriza, S., Rufián-Henares, J. A., Delgado, G., 2022. Why Should We Be Concerned with the Use of Spent Coffee Grounds as an Organic Amendment of Soils? A Narrative Review. *Agronomy* 12, 2771.

Piterina, A. V., Barlett, J. & Pembroke, J. T., 2009. ¹³C-NMR Assessment of the Pattern of Organic Matter Transformation during Domestic Wastewater Treatment by Autothermal Aerobic Digestion (ATAD). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6, 2288-2306.

Praharaj, S., Skalicky, M., Maitra, S., Bhadra, P., Shankar, T., 2021. Zinc Biofortification in Food Crops Could Alleviate the Zinc Malnutrition in Human Health. *Molecules* 26, 3509.

Prasad, R., Shivay, Y. S. & Kumar, D., 2014. Agronomic Biofortification of Cereal Grains with Iron and Zinc. *Advances in Agronomy* 125, 55-91.

Prates Pereira, A., Woodman, T. J., Brahmabhatt, P. & Chuck, C. J., 2019. The Optimized Production of 5-(Hydroxymethyl)furfural and Related Products from Spent Coffee Grounds. *Applied Sciences* 9(16), 3369.

Preciado-Rangel, P., Valenzuela-García, A. A., Pérez-García, L. A., González-Salas, U., Ortiz-Díaz, S. A., Buendía-García, A., Puente, E.O.R., 2022. Foliar biofortification with iron improves nutraceutical quality and antioxidant capacity in lettuce. *Terra Latinoamericana* 40, 1-7.

Ramón-Gonçalves, M., Alcaraz, L., Pérez-Ferreras, S., León-González, M. E., Rosales-Conrado, N., López, F. A., 2019. Extraction of polyphenols and synthesis of new activated carbon from spent coffee grounds. *Scientific Reports* 9, 17706.

Rasmussen, J. A. & Einhellig, F. A., 1977. Synergistic inhibitory effects of p-coumaric and ferulic acids on germination and growth of grain sorghum. *Journal of Chemical Ecology* 3(2), 197-205.

- Rathinavelu, R. & Graziosi, G., 2005. *Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café*, Trieste, Italia.
- Reigosa, M., Souto, X. & González, L., 1999. Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regulation* 28, 83–88.
- Rietra, R. P. J. J., Heinen, M., Dimkpa, C. O. & Bindraban, P. S., 2017. Effects of Nutrient Antagonism and Synergism on Yield and Fertilizer Use Efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 48(16), 1895–1920.
- Rillig, M. C., Wagner, M., Salem, M., Antunes, P. M., George, C., Ramke, H. G., Titirici, M. M., Antonietti, M., 2010. Material derived from hydrothermal carbonization: Effects on plant growth and arbuscular mycorrhiza. *Applied Soil Ecology* 45, 238–242.
- Rivelli, A. R. & Libutti, A., 2022. Effect of Biochar and Inorganic or Organic Fertilizer Co-Application on Soil Properties, Plant Growth and Nutrient Content in Swiss Chard. *Agronomy* 9(12), 2089.
- Rodríguez, J. M., 2018. *Estudio de la valorización de residuos alimentarios mediante su transformación en productos de alto valor añadido*, Trabajo de fin de máster, Universidad de Granada.
- Rousseau, S., Kyomugasho, C., Celus, M., Hendrickx, M. E. G., Grauwet, T., 2019. Barriers impairing mineral bioaccessibility and bioavailability in plant-based. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 238–242.
- Ruan, Z., Hollinshead, W., Isaguirre, C., Tang, Y. J., Liao, W., Liu, Y., 2015. Effects of inhibitory compounds in lignocellulosic hydrolysates on *Mortierella isabellina* growth and carbon utilization. *Bioresource Technology* 183, 18–24.
- Rufford, T. E., Hulicova-Jurcakova, D., Zhu, Z. & Lu, G. Q., 2008. Nanoporous carbon electrode from waste coffee beans for high performance supercapacitors. *Electrochemistry Communications* 10, 1594–1597.
- Rufián-Henares, J. A. & De La Cueva, S. P., 2009. Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins - A Study of Their Metal-Chelating Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 432–438.

Santos, C., Fonseca, J., Aires, A., Coutinho, J., Trindade, H., 2017. Effect of different rates of spent coffee grounds (SCG) on composting process, gaseous emissions and quality of end-product. *Waste Management* 59, 37–47.

Santos-Martín, F., Zorrilla-Miras, P., Palomo, I., Montes, C., Benayas, J., Maes, J., 2019. Protecting nature is necessary but not sufficient for conserving ecosystem services: A comprehensive assessment along a gradient of land-use intensity in Spain. *Ecosystem Services* 35, 43–51.

Shafei, M., 2023. *Ennomotive*. [Online] Available at: <https://www.ennomotive.com/hydrothermal-carbonization-htc/> [Accessed 07 02 2023].

Simoës, J., Madureira, P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., Vilanova, M., Coimbra, M. A., 2009. Immunostimulatory properties of coffee mannans. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 1036 – 1043.

Sun, K., Han, L., Yang, Y., Xia, X., Yang, Z., Wu, F., Li, F., Feng, Y., Xing, B., 2020. Application of Hydrochar Altered Soil Microbial Community Composition and the Molecular Structure of Native Soil Organic Carbon in a Paddy Soil. *Environmental Science & Technology* 54, 2715–2725.

Szerement, J., Szatanik-Kloc, A., Mokrzycki, J. & Mierzwa-Hersztek, M., 2022. Agronomic Biofortification with Se, Zn, and Fe: An Effective Strategy to Enhance Crop Nutritional Quality and Stress Defense—A Review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 22, 1129–1159.

Takenaka, M., Sato, N., Asakawa, H., Wen, X., Murata, M., Homma, S., 2005. Characterization of a Metal-Chelating Substance in Coffee. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry* 69, 26–30.

Tokimoto, T, Kawasaki, N., Nakamura, T., Akutagawa, J., Tanada, S., 2005. Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass. *Journal of Colloid and Interface Science* 281(1), 56–61.

UNIDO, 2020. *United Nations Industrial Development Organization*. [Online] Available at: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.unido.org/sites/default/files/files/2020-09/Circular_economy_in_AGR.pdf](https://www.unido.org/sites/default/files/files/2020-09/Circular_economy_in_AGR.pdf) [Accessed 03 02 2023].

Vardon, D. R., Moser, B. R., Zheng, W., Witkin, K., Evangelista, R. L., Strathmann, T. J., Rajagopalan, K., Sharma, B. K., 2013. Complete Utilization of Spent Coffee Grounds To Produce Biodiesel, Bio-Oil, and Biochar. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 1(10), 1286–1294.

Vela-Cano, M., Cervera-Mata, A., Purswani, J., Pozo, C., Delgado, G., González-López, J., 2019. Bacterial community structure of two Mediterranean agricultural soils amended with spent coffee grounds. *Applied Soil Ecology* 137, 12–20.

Wang, Z., Zhang, Z., Li, S., Zhang, X., Xia, M., Xia, T., Wang, M., 2021. Formation mechanisms and characterisation of the typical polymers in melanoidins from vinegar, coffee and model experiments. *Food Chemistry* 355, 129444.

Wilson, C. A. & Novak, J. T., 2009. Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. *Water Research* 43, 4489–4498.

Xiao, L.-P., Shi, Z.-J., Xu, F. & Sun, R.-C., 2012. Hydrothermal carbonization of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 118, 619–623.

Yamane, K., Kono, M., Fukunaga, T., Iwai, K., Sekine, R., Watanabe, Y., Iijima, M., 2014. Field Evaluation of Coffee Grounds Application for Crop Growth Enhancement, Weed Control, and Soil Improvement. *Plant Production Science* 17(1), 93-102.

Yokota, S., Nishimoto, A. & Kondo, T., 2022. Alkali-activation of cellulose nanofibrils to facilitate surface chemical modification to facilitate surface chemical modification. *Journal of Wood Science*, 68(14).

Zhang, Z., Zhu, Z., Shen, B. & Liu, L., 2019. Insights into biochar and hydrochar production and applications: A review. *Energy* 171, 581-598.

Zhao, A., Yang, S., Wang, B. & Tian, X., 2019. Effects of ZnSO₄ and Zn-EDTA applied by broadcasting or by banding on soil Zn fractions and Zn uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) under greenhouse conditions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 1–11.

Zou, C. Q., Zhang, Y. Q., Rashid, A., Ram, H., Savasli, E., Arisoy, R. Z., Ortiz-Monasterio, I., Simunji, S., Wang, Z. H., Sohu, V., Hassan, M., Kaya, Y., Onder, O., Lungu, O., Yaqub Mujahid, M., Joshi, A. K., Zelenskiy, Y., Zhang, F. S., Cakmak, I., 2012. Biofortification of wheat with zinc through zinc fertilization in seven countries. *Plant Soil* 361, 119–130.

Zulfiqar, U., Maqsood, M., Hussain, S. & Anwar-ul-Haq, M., 2020. Iron Nutrition Improves Productivity, Profitability, and Biofortification of Bread Wheat under Conventional and Conservation Tillage Systems. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 20, 1298–1310.

7. ANEXOS

Anexo I. Pruebas de biofortificación en invernadero.

Dados los resultados positivos encontrados en los ensayos *in vitro* (cámara climática) con la activación de las partículas previo a su funcionalización, que ha llevado a una mejora en la captación de minerales en su estructura y una reducción de los efectos fitotóxicos, se están llevando a cabo pruebas para reproducir y comprobar los hallazgos a una escala más real utilizando cultivos bajo invernadero.

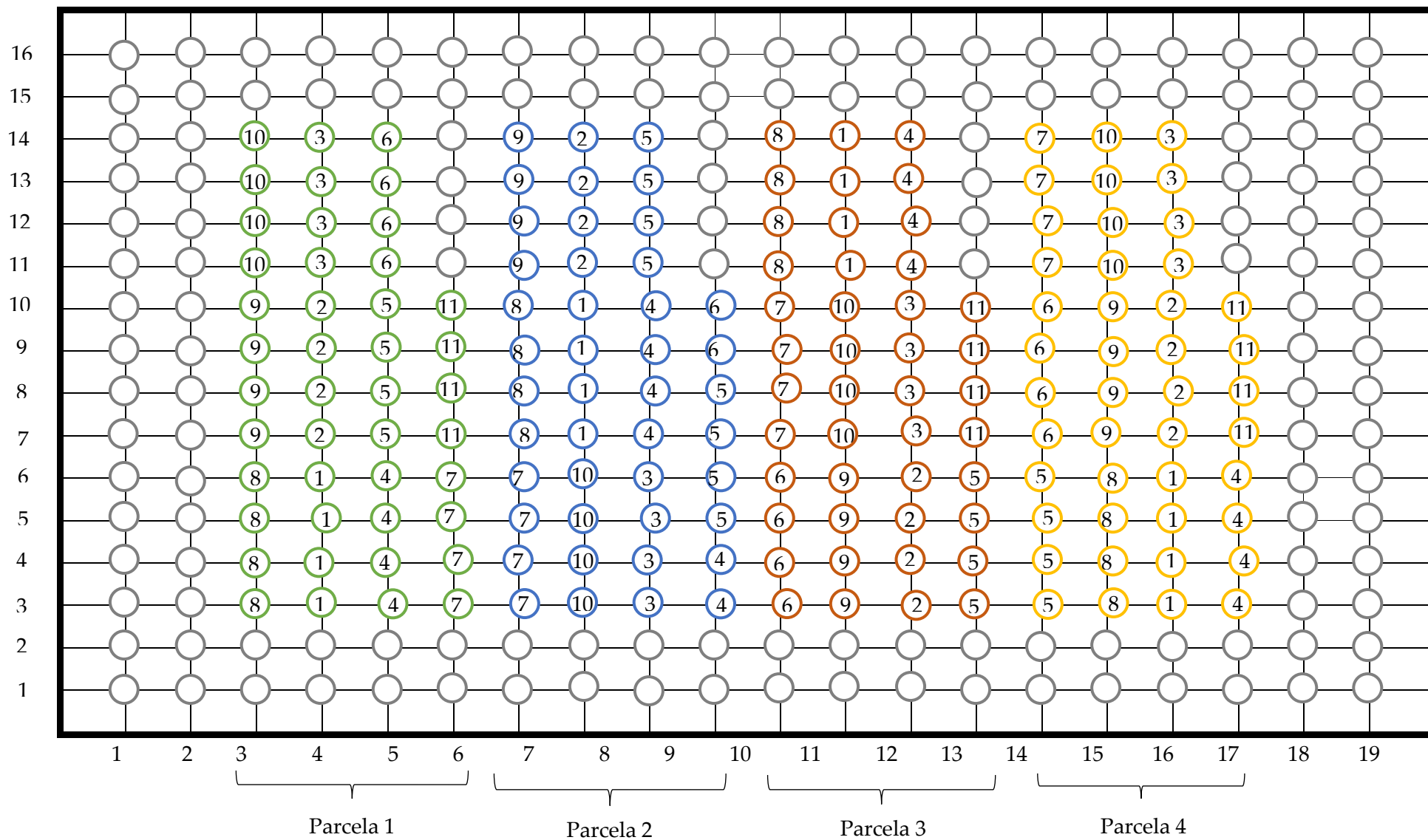
DISEÑO DEL ENSAYO

- Localidad: Estación experimental Fundación Cajamar. Las Palmerillas, El Ejido, Almería.
- Planta: pepino holandés (*Cucumis sativus*)
- Micronutrientes ensayados: Zn, Fe
- Bio-productos: Se emplearon 4 tipos: (a) los SCG frescos (no transformados), (b) SCG frescos activados, (c) hidrochars de SCG obtenidos a 160°C (H160), y (d) H160 activados. Todos los bio-productos se funcionalizaron con sales de Zn y Fe dando lugar a **8 bio-quelatos**: 4 de Zn y 4 de Fe.

Además, se incluyeron otros bio-productos que paralelamente en el grupo de investigación se han ensayado obteniendo resultados muy prometedores: harina de sangre (HS) e hidrolizado de harina de sangre (HHS).

- Dosis: 0.2% para bio-productos derivados de SCG y 5 mg/kg para HS y HHS.
- Suelo: Nativo del invernadero. Se prevé análisis para su caracterización.
- Diseño experimental: Se establecerán dos controles:
 - Quelato comercial: Zn y Fe, a dosis de 10 mg/kg suelo.
 - Suelo sin bio-producto alguno.

Se realizarán 4 repeticiones (1 en cada parcela) por tratamiento (8 bio-quelatos + 2 bio-productos extra + 3 controles) y cada repetición constará de 4 plantas; en total 208 plantas.



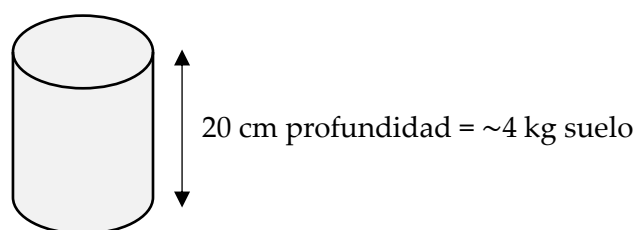
Detalle de tratamientos:

Número	Tratamiento
1	Control (nada)
2	Q. Comercial Fe
3	Q. Comercial Zn
4	ASCG
5	AH160
6	ASCG-Fe
7	ASCG-Zn
8	AH160-Fe
9	AH160-Zn
10	HHS
11	HS

ASCG: posos de café activados; ASCG-X: posos de café activados y funcionalizados; AH160: hidrochar de posos de café activados; AH160-X: hidrochar de posos de café activados y funcionalizados; HHS: hidrolizado de harina de sangre; HS: harina de sangre.

PROCEDIMIENTO DE EMPLEO

- Localizar los puntos en los que se realizarán los agujeros (0.5 m entre cada punto) y limpiar la superficie con un rastrillo pequeño.
- Hacer perforar el suelo hasta una profundidad aproximada de 20 cm con la ayuda de una ahoyadora.



- Recolectar el suelo extraído de cada agujero y llevarlo al punto central común destinado dentro del invernadero. Aproximadamente al término de las primeras columnas, mezclar ligeramente todo el conjunto y pesar en la balanza 64 kg de suelo (cantidad total de suelo necesario para un tratamiento entero).
- Introducir en la hormigonera los 64 kilos de suelo y añadir el bio-producto correspondiente. Mezclar durante 5 minutos.

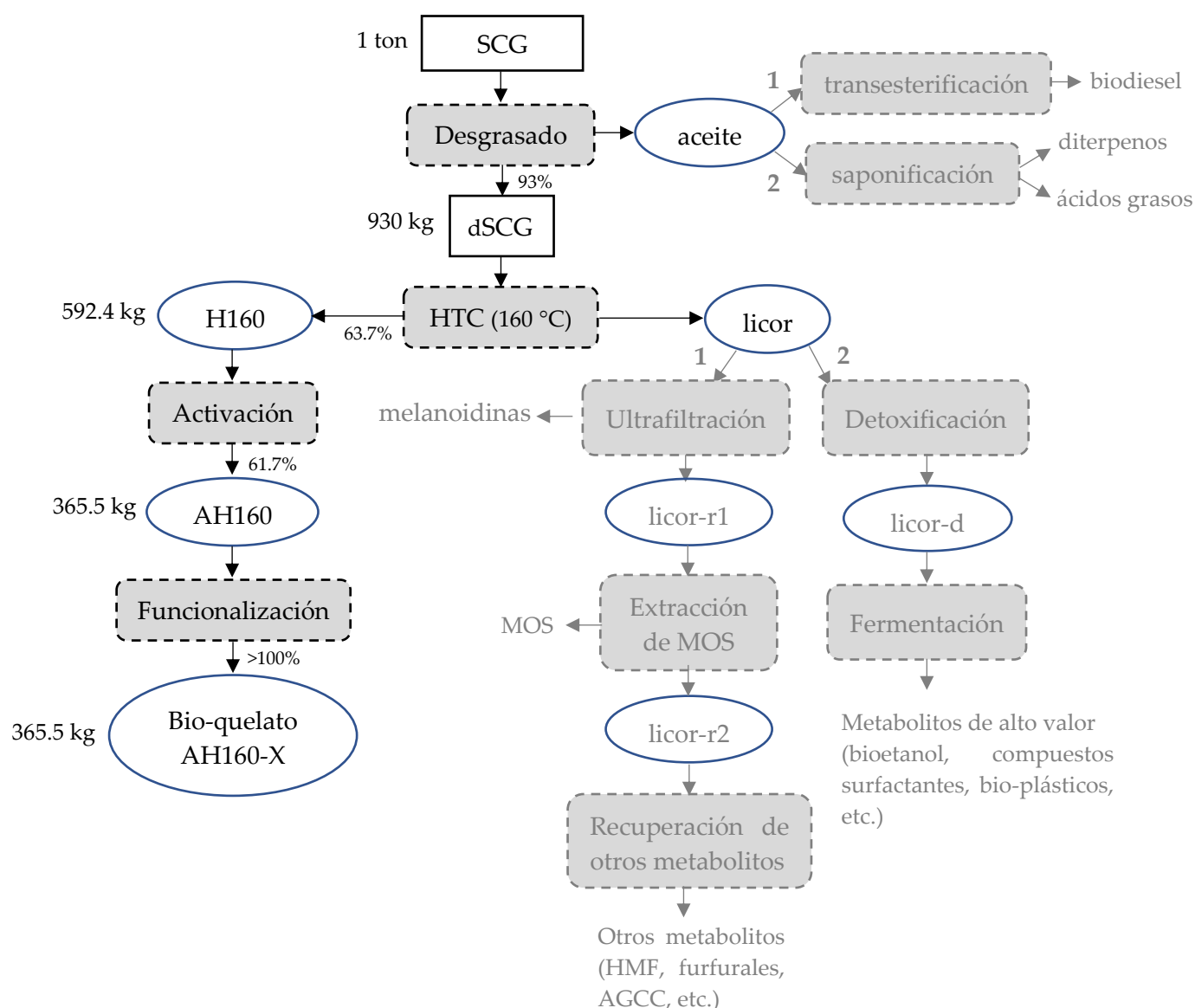
- Sacar la mezcla en un saco y poner aparte. Hacer lo mismo con cada tratamiento limpiando la cuba de la hormigonera.
- De cada saco de mezcla pesar 16 porciones de 4 kg en bolsas separadas debidamente identificadas.
- Rellenar los agujeros con el contenido de cada bolsa. Para el caso de los quelatos comerciales, después de rellenar el agujero con suelo, adicionar 100 ml del quelato comercial que corresponda.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se tomará en cuenta el peso seco (PS), peso fresco (PF) y contenido mineral del fruto. Los datos se agruparán de acuerdo con las tandas de cosecha realizadas en un tiempo estimado de 3 meses. Paralelo a esto, se realizará también un análisis general del suelo que incluirá: pH, conductividad eléctrica y contenido de Zn y Fe extraíbles con DTPA. Esta fase está en desarrollo.

Anexo II. Propuesta de biorrefinería

En base a los procesos explorados en esta tesis doctoral y a la revisión bibliográfica realizada para el mismo fin, se presenta una propuesta de biorrefinería de los SCG enfocada en la obtención de bio-quelatos agrícolas a partir de hidrochars. En este diseño se han acoplado una variedad de bio-procesos con el fin de conseguir un aprovechamiento íntegro de los subproductos generados.



dSCG: posos de café desgrasados; H160: hidrochar obtenido a 160 °C; AH160: hidrochar activado; AH160-X: hidrochar activado y funcionalizado con "X" micronutriente; licor-r1: licor residual 1; licor-r2: licor residual 2; licor-d: licor detoxificado.