



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE UNA CEPA DE  
MICROALGA ECUATORIANA PARA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A  
ESCALA PILOTO

Autora

Carla Cristina Cárdenas Valladares

Año  
2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE UNA CEPA DE  
MICROALGA ECUATORIANA PARA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A  
ESCALA PILOTO

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos  
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora Guía  
MSc. Mayra Fernanda Chico Terán

Autora  
Carla Cristina Cárdenas Valladares

Año  
2017

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación

---

Mayra Fernanda Chico Terán

Máster en Biotecnología

CI: 1003327044

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

---

María Alejandra Cruz Salazar  
Máster en Biotecnología y Bioprocesos  
CI: 171992857-2

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTIFICO**

Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

---

María Cristina Guamán Burneo  
Máster en Microbiología Industrial  
CI: 1103950513

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

---

Carla Cristina Cárdenas Valladares

CI: 1722310727

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco por esta primera etapa en mi vida pre-profesional a mis padres por la confianza entregada a su hija; a todos los maestros de la Universidad por sus sabias enseñanzas, guías, tiempo y dirección en el conocimiento, mismos que deberán ir mejorando al mismo ritmo del tiempo; y especialmente a Cristina Guamán y Nory Gonzalez, quienes fueron mis instructoras, maestras y el soporte fundamental en esta investigación en el BIOTEC, pues su apoyo y mi aporte hicieron posible tener el resultado obtenido.

## RESUMEN

Los combustibles fósiles son de consumo masivo a nivel mundial, sin embargo, el uso de estos combustibles genera niveles de contaminación altos y consecuencias relacionadas al efecto invernadero. Por estas razones, las investigaciones se han enfocado en la generación de combustibles amigables con el planeta. El biodiesel es un biocombustible similar al diésel de petróleo con la diferencia de que tiene una procedencia orgánica por lo que genera menos contaminación al ambiente. Una de las materias primas para la generación de biodiesel son las microalgas debido a que estos microorganismos producen cantidades lipídicas adecuadas para la generación de biodiesel.

En esta investigación se seleccionó 14 cepas de microalgas nativas ecuatorianas pertenecientes al Consorcio de Microalgas del Ecuador. Estas cepas fueron reactivadas ya que se encontraban conservadas a una temperatura de 4° C. Los cultivos fueron escalados a nivel piloto en fotobiorreactores tubulares en forma de "V" hasta alcanzar un volumen final de 40 L y una concentración celular de  $1 \times 10^7$  cel.ml<sup>-1</sup>, se realizó un análisis de grasas totales a la biomasa obtenida de las diferentes cepas de microalgas con la finalidad de seleccionar una especie de microalga ecuatoriana pura para la elaboración de biodiesel.

La cepa CMIE-B2-001 presentó una concentración celular más alta a los 20 días de cultivo y mayor porcentaje de grasa totales en peso seco por lo que fue seleccionada para la elaboración de biodiesel. Se realizó una lisis celular con choque osmótico con NaCl a una concentración de 1M y un tratamiento de microondas a 5 min a una potencia de 2450 MHz. Posteriormente, se realizó la extracción lipídica con dos mezclas de solventes (Hexano- Etanol y Hexano-Isopropanol) y se determinó que no hubo una diferencia significativa en el uso de estos solventes debido a que se obtuvo un valor de P de 0.158. A continuación, se transesterificó el aceite microalgal obtenido de los distintos tratamientos de extracción con los distintos solventes en donde se observó la separación de fases por lo que se infiere la obtención de biodiesel. El volumen obtenido fue bajo, por lo tanto, no se pudo realizar los análisis físico-químicos, sin embargo, se obtuvo una eficiencia porcentual de 65%.



## ABSTRACT

Fossil fuels are highly consumed worldwide and therefore of great importance. However, the use of these fuels generates very high pollution levels and greenhouse problems. For these reasons, the researches of the last decades have been focused on the generation of friendly fuels with the planet in order to reduce the consumption of fossil fuels. Biodiesel is a biofuel similar to petroleum diesel, but it has an organic origin so it generates less pollution to the environment. Biodiesel can be produced with microalgae because these microorganisms produce lipids suitable for the generation of biodiesel.

In this research, 14 strains of Ecuadorian native microalgae belonging to the "Consortio de Microalgas del Ecuador" were selected. These strains were reactivated due to they were conserved at a temperature of 4 ° C. Subsequently the reactivated strains were subjected to a pilot scale scaling in tubular V-shaped photobioreactors until reaching a final volume of 40 L at a cellular concentration of  $1 \times 10^7$  cel.ml<sup>-1</sup>, an analysis of total fat was carried out to the biomass obtained from the different microalgae strains in order to choose a species of Ecuadorian microalgae for biodiesel production.

The CMIE-B2-001 strain presented the highest cellular concentration at 20 days of cultivation and the highest percentage of total fat in dry biomass, so it was selected for biodiesel production. Cellular lysis was performed with osmotic shock with NaCl at a concentration of 1M and a microwave treatment at 5 min at a power of 2450 MHz. Subsequently, the mixture of two solvents for lipid extraction (Hexane-Ethanol and Hexane- Isopropanol) was analyzed. However, the analyzes indicated that there was no significant difference between solvents because a P value of 0.158 was obtained. Then, a transesterification reaction was performed on the microalgal oil obtained from the different extraction treatments where a percentage efficiency of 65% was determined.

## ÍNDICE

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	3
1.3 Objetivos .....	4
1.3.1. Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos .....	4
1.4 Justificación de la Investigación .....	4
2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Biocombustibles .....	5
2.1.1. Generalidades de los biocombustibles .....	5
2.1.2. Tipos de Biocombustibles.....	6
2.1.3. Biodiesel.....	6
2.2 Microalgas. ....	8
2.2.1 Generalidades de las microalgas .....	8
2.2.2 Clasificación de las microalgas.....	9
2.3 Producción de biocombustibles a partir de microalgas.....	9
2.3.1 Producción de biodiesel a partir de distintos tipos de biomasa .....	10
2.4 Procesos upstream para la producción de biodiesel a partir de microalgas.....	13
2.4.1 Bioprospección de microalgas.....	13
2.4.2 Obtención de biomasa microalgal .....	15
2.5 Proceso Downstream para la producción de biodiesel a partir de microalgas.....	20
2.5.1 Cosecha de biomasa.....	20
2.5.2 Ruptura celular .....	22
2.5.3 Extracción lipídica.....	23
2.5.4 Transesterificación .....	25
3. CAPITULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ...	26

3.1 Método Estadístico .....	26
3.2 Hipótesis estadística .....	27
<b>4. CAPITULO IV. PROCEDIMIENTOS .....</b>	<b>27</b>
4.1. Selección morfológica de cepas de microalgas ecuatorianas y reactivación en medios de cultivo .....	27
4.2. Escalamiento de cepas.....	30
4.2.1 Escalamiento a nivel de laboratorio.....	30
4.2.2 Escalamiento a nivel piloto en fotobiorreactores .....	31
4.3. Cosecha y Secado de la biomasa microalgal .....	32
4.3.1 Floculación de biomasa.....	32
4.3.2 Secado de biomasa floculada .....	32
4.4 Análisis de grasas totales .....	33
4.5 Evaluación del crecimiento de cepas de microalgas.....	33
4.5.1 Determinación de curva de crecimiento .....	33
4.5.2 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación celular.....	33
4.6 Lisis celular.....	34
4.7 Extracción lipídica .....	35
4.8 Análisis de perfil lipídico .....	35
4.9 Análisis Estadístico.....	35
4.10 Transesterificación.....	36
<b>5. CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
5.1 Selección morfológica de cepas de microalgas ecuatorianas y reactivación en medios de cultivo .....	36
5.2 Escalamiento de cepas.....	38
5.2.1 Escalamiento a nivel de laboratorio .....	38
5.2.2 Escalamiento a nivel piloto en fotobiorreactores.....	41
5.3 Cosecha y Secado de la biomasa microalgal .....	43
5.3.1 Floculación de biomasa .....	43
5.3.2 Secado de biomasa floculada.....	45

5.4	Análisis de Grasas totales .....	45
5.5	Evaluación del crecimiento de cepas de microalgas .....	47
5.5.1	Determinación de curva de crecimiento.....	47
5.5.2	Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación celular .....	48
5.6	Lisis celular .....	49
5.7	Extracción de lípidos.....	51
5.8	Análisis de perfil lipídico .....	53
5.9	Análisis Estadístico .....	55
5.10	Transesterificación.....	56
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	59
6.1	Conclusiones.....	59
6.2	Recomendaciones .....	59
	REFERENCIAS .....	61
	ANEXOS .....	70

## 1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El petróleo es una fuente de energía de gran importancia a nivel mundial, sin embargo, éste es un combustible fósil y genera grandes problemas de contaminación. Principalmente, produce gases contaminantes que contribuyen al efecto invernadero como la combustión de los derivados del petróleo que emite altas cantidades de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y monóxido de carbono (CO) al ambiente. Estos gases se mantienen en la atmósfera y provocan el calentamiento global y cambio climático que induce cambios meteorológicos en la Tierra como: el deshielo de los glaciares y sequías (Atabani et al., 2012; Flores, Hernández, & Hernández, 2015; Hossain, Salleh, Boyce, Chowdhury, & Naqiuddin, 2008).

La búsqueda de energías renovables que produzcan menos contaminación se ha evaluado durante décadas y ha tenido como resultado la producción de varios tipos de biocombustibles, como el biodiesel (Antunes & Silva, 2010). Hasta el año 2014 el 80.8% de la producción mundial de energía fue a base de combustibles fósiles (Banco Mundial, 2017), por lo que sustituir en su totalidad este tipo de combustibles es imposible. Sin embargo, nuevas alternativas energéticas se han investigado con el fin de disminuir el uso de los combustibles fósiles por lo que la producción de biodiesel a partir de materia orgánica resulta ser una buena alternativa. Por otro lado, varios autores afirman que las reservas de combustibles fósiles se acabarán en menos de 50 años debido a la demanda mundial del petróleo y tomando en cuenta que no es un recurso renovable, la búsqueda de nuevas fuentes de energía es inminente (Burgos, 2017; Quemada, & Gonzales, 2013; Rodolfi et al., 2009)

El biodiesel es una alternativa de combustible biodegradable y no tóxico obtenido de fuentes renovables. Este puede ser obtenido de productos como: la soya, el girasol, la canola, el coco, la palma, residuos agrícolas, aceites utilizados, la

grasa animal y las algas (Hossain et al., 2008). El biodiesel comercial actualmente se obtiene de grasa animal, residuos de aceite de cocina y aceites vegetales. Sin embargo, la producción con este tipo de materia prima no cumple la demanda requerida a nivel mundial (Chen, Yeh, Aisyah, Lee, & Chang, 2011). Chisti (2007) afirma que se necesitarían 0.53 billones m<sup>3</sup> anuales de biodiesel en Estados Unidos para poder reemplazar la cantidad de combustibles que se ocupa en el área de transporte. También indica que la cantidad de biodiesel que se genera anualmente no cubre la cifra requerida para un reemplazo total del diésel.

Actualmente, son varios los países que han optado por la producción masiva de biodiesel. Hasta el año 2015, Estados Unidos y Brasil fueron los mayores productores de este biocombustible con una producción final de 4,8 y 4,1 billones de litros de biodiesel respectivamente. Otros países productores son Alemania, Francia, Argentina y Holanda, con producciones menores a los 3 billones de litros (Sawin, Seyboth, Sverrisson, 2017). En el año 2015 se produjo 30,1 billones de litros, siendo la Unión Europea el mayor productor de biodiesel procedente de diversas materias primas (Atabani et al., 2012; Sawin, Seyboth, Sverrisson, 2016).

El biodiesel promete ser una de las mejores opciones de biocombustibles debido su biodegradabilidad y baja toxicidad. Este busca reemplazar al diésel de petróleo en distintas aplicaciones teniendo como objetivo principal máquinas de combustión interna debido a que evita la producción de sulfuro, CO<sub>2</sub>, CO, y partículas que se desprenden en la combustión (Atabani et al., 2012).

En los últimos años se han buscado nuevas fuentes para la generación de biodiesel; las macro y microalgas han sido de gran interés ya que presentan características necesarias para la producción de biodiesel como la presencia de grandes cantidades de lípidos y en el caso de las microalgas presentan un metabolismo acelerado lo que permite que tengan un mayor crecimiento (Chisti, 2007; Yan et al., 2014).

El Laboratorio de Biotecnología Energética, BIOTEC, ha elaborado el primer catálogo de microalgas del Ecuador georeferenciado, donde se tiene el registro de los géneros de microalgas del sistema lacustre de los Andes y Amazonía del Ecuador. Hasta el momento no se ha registrado estudios moleculares de microalgas colectadas en áreas protegidas, por lo tanto, la taxonomía completa de las especies de microalgas es inexistente. No obstante, en el BIOTEC se han desarrollado varias investigaciones como: la remoción de contaminantes de mercurio (Vela, 2016), la remoción de contaminantes en un reservorio (Meneses, 2015), el análisis de biofloculantes para la obtención de biomasa microalgal (Cabrera, 2016), la captación de CO<sub>2</sub> mediante la utilización de biofiltros con microalgas (Velasco, 2016) y la comparación de fotobiorreactores para la producción de biomasa (Paez, 2016). Todos estos estudios se han realizado con microalgas del sistema lacustre nacional.

Asimismo, existen varias investigaciones con interés biotecnológico para la producción de biodiesel de microalgas nativas del Ecuador realizadas en otras instituciones. Por ejemplo, existen varios reportes de *Chorella sp.*, en donde se indica que presenta 7,31% (G. Ruiz, 2015); 21% (Quintanilla, 2016) y 9% (Hinojosa, 2015) de lípidos requeridos para la producción de biodiesel. Sin embargo, no existe una empresa o institución en Ecuador que genere biomasa microalgal a nivel industrial para la producción de biodiesel.

## **1.2 Planteamiento del problema**

El Ecuador es biodiverso tanto en especies vegetales, animales y de microorganismos. Dentro de la división de microorganismos se encuentran las microalgas de las cuales el estudio sobre la biodiversidad ecuatoriana ha empezado hace pocos años. Sin embargo, aún se desconoce la biodiversidad microalgal total que posee el Ecuador tanto a nivel marítimo como lacustre.

Asimismo, se desconoce las potenciales aplicaciones de interés biotecnológico que las distintas especies de microalgas nativas ecuatorianas podrían tener, como es el caso de las microalgas oleaginosas, capaces de producir cantidades

necesarias de ácidos grasos de cadena larga los cuales son esenciales para la elaboración de biodiesel, producto de alto interés biotecnológico y ambiental debido a las propiedades que presenta.

La obtención de biodiesel consta de una larga lista de procedimientos a seguir para lograr una eficiencia significativa de producción en donde uno de los pasos más importantes es la extracción de lípidos, puesto que el aceite microalgal es intracelular y hasta el momento se desconoce el método más efectivo de extracción por mezcla de solventes polares y no polares a microalgas nativas ecuatorianas.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Obtener biodiesel utilizando una cepa de microalga nativa ecuatoriana como materia prima.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Seleccionar cepas de microalgas ecuatorianas potencialmente productoras de lípidos.
- Obtener biomasa de una cepa que presente mayor producción de lípidos.
- Evaluar las características físico-químicas del biodiesel obtenido de la extracción de lípidos de la cepa seleccionada.

### **1.4 Justificación de la Investigación**

La generación de conocimiento sobre la biodiversidad ecuatoriana mediante investigaciones y estudios es de importancia nacional. En el área de estudios de microorganismos, como las microalgas, se puede obtener datos interesantes debido a la diversidad de climas y factores que existen en el Ecuador, los cuales



intervienen para que haya una gran biodiversidad. La investigación de cepas nativas de microalgas proporcionará información relevante para cualquier tipo de aplicación biotecnológica como, el estudio de cepas puras de microalgas capaces de producir biodiesel puede emitir información que podría ser importante. La presente investigación proporcionará los primeros datos de una cepa de microalga nativa colectada en un área protegida para la producción específica de biodiesel.

La investigación sobre microalgas ecuatorianas es importante debido a la información que se puede encontrar y la preselección de microalgas potencialmente productoras de lípidos reduce la cantidad de especies de microalgas que se deben analizar para obtener resultados positivos. También es importante que dichas especies de microalgas produzcan cantidades de biomasa considerables para realizar los estudios respectivos y determinar la viabilidad de trabajar con dichas especies.

La evaluación de las características físico-químicas del biodiesel contribuye a la determinación de la calidad del producto obtenido con la finalidad de establecer si el producto es apto para consumo en distintas industrias.

## **2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Biocombustibles**

#### **2.1.1. Generalidades de los biocombustibles**

Los biocombustibles son aquellos combustibles generados a partir de biomasa de origen animal, vegetal o de residuos orgánicos. Estos son altamente estudiados debido a que la materia prima con la que se los produce es renovable al contrario de los combustibles fósiles. El objetivo de los biocombustibles es cubrir las necesidades energéticas del transporte, la generación de electricidad

y la industria. Estos se clasifican en biocombustibles sólidos, líquidos y gaseosos (Dufey, 2016; Fernandez, 2004).

### **2.1.2. Tipos de Biocombustibles**

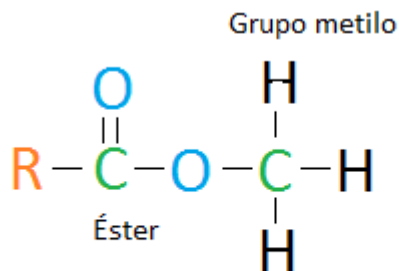
Los biocombustibles sólidos son los más antiguos. Entre éstos, se encuentra el combustible sólido recuperado (Refuse-Derived fuel) que es producido con residuos sólidos urbanos mediante tratamientos térmicos y mecánicos. Así como también los pelets (pellets) y la leña que son obtenidos de bosques y de residuos forestales y agrícolas (Alam et al., 2012 ; Fernandez, 2004; Petrou, 2009).

Los biocombustibles líquidos son combustibles bioquímicos naturales obtenidos de materia prima renovable como el biodiesel, el bioetanol y biometanol. Los biocombustibles líquidos más utilizados a nivel mundial son el biodiesel y el bioetanol, los cuales remplazan al diésel y la gasolina respectivamente (Alam et al., 2012 ; Fernandez, 2004; Petrou, 2009)

Los biocombustibles gaseosos son generalmente producidos por procesos térmicos de pirólisis, digestión o de degradación de biomasa con microorganismos. Entre los gases más comunes se encuentra el metano, el hidrógeno, el CO y el CO<sub>2</sub> (Alam et al., 2012 ; Fernandez, 2004; Petrou, 2009).

### **2.1.3. Biodiesel**

El biodiesel está formado por ácidos grasos de cadena larga, como ácido palmítico, esteárico, oleico, y linoleico; y de monoalquil-ésteres de alcoholes de cadena corta (Figura 1). Los ácidos grasos se obtienen de biomasa renovable; es decir, de materiales biológicos, mientras que los monoalquil-ésteres son obtenidos de alcoholes por lo general de etanol y metanol (Aransiola, Ojumu, Oyekola, Madzimbamuto, & Ikhu-Omoregbe, 2014; Hossain et al., 2008; Lee, Yoo, Jun, Ahn, & Oh, 2010)



R: ácido graso de cadena larga (entre 16 y 18 carbonos).

*Figura 1.* Metiléster de ácido graso o biodiesel.

a) Estructura química de la molécula de metiléster en donde se puede observar el grupo metilo, éster y R que representa los ácidos grasos.

El biodiesel es producido a partir biomasa obtenida de distintos tipos de materiales orgánicos que por lo general son organismos fotosintéticos. La producción de la biomasa de estos organismos ayuda a la eliminación de óxidos de carbono del ambiente debido a la fotosíntesis que realizan. Es decir, el CO<sub>2</sub> que se produce en la combustión del biodiesel se compensa en la absorción de CO<sub>2</sub> en la fotosíntesis de los organismos con los que se produce éste biocombustible, por lo tanto, el balance de CO<sub>2</sub> en el ambiente no se ve afectado (Hossain et al., 2008; Monari, Righi, & Olsen, 2016).

El biodiesel no emite sulfuro e hidrocarburos, y la cantidad de CO y material particulado es menor que el emitido en otros procesos; sin embargo, produce una mayor cantidad de óxidos de nitrógeno, los cuales contribuyen a la formación de smog (Atabani et al., 2012; Hoekman & Robbins, 2012; Knothe, Krahl, & Van Gerpen, 2015) .

El punto de inflamabilidad del biodiesel (150 °C) es mucho más alto que el diésel de petróleo (52 °C – 66 °C) o la gasolina (-40°C) y esto indica que es un combustible más seguro. La combustión de diésel a partir de petróleo produce una mayor cantidad de hollín en comparación al biodiesel, esto se debe a las moléculas de oxígeno que están presentes en la composición química de éste biocombustible. Por otro lado, el biodiesel presenta un menor contenido de energía calorífica (37,2 MJ.kg<sup>-1</sup>) en comparación al diésel (42,6 MJ.kg<sup>-1</sup>) en un

12,5%; sin embargo, el biodiesel es más denso y viscoso por lo tanto la potencia en un motor al usar biodiesel se reduce aproximadamente en un 8% (Aransiola et al., 2014; Knothe et al., 2015).

El uso del biodiesel presenta varias ventajas, principalmente a nivel ambiental. Sin embargo, en la estructura molecular del biodiesel se encuentran los ésteres metílicos, los cuales son capaces de disolver tanto el caucho como la goma y es por ésta razón que algunos componentes que se encuentran en los motores de los vehículos tales como: mangueras, sellos o juntas; pueden deteriorarse con la presencia del biodiesel. Además, el biodiesel presenta un punto de congelación alto, entre 0 y -5 °C, lo cual afectaría en autos que operen a temperaturas bajas (Jimenez, 2008).

## **2.2 Microalgas.**

### **2.2.1 Generalidades de las microalgas**

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos eucariotes. Presentan un crecimiento mayor a cualquier macro organismo vegetal. Las microalgas pueden ser encontradas en cualquier superficie acuática, es decir, habitan en una gran variedad de zonas como: sistemas lacustres, salobres, híper salinos, de agua dulce, aguas residuales, sistemas fluviales y en represas (Chisti, 2007; Fishman, Majumdar, Morello, Pate, & Yang, 2010; Mutanda et al., 2011). Se estima que pueden haber alrededor de 300 000 especies (Mata, Martins, & Caetano, 2010)

El interés por las microalgas ha aumentado en los últimos años debido a las aplicaciones que se han encontrado. Por ejemplo, para la producción de varios tipos de biocombustibles, así como también aplicaciones en el área ambiental, alimentaria y farmacéutica (Mata et al., 2010; Priyadarshani & Rath, 2012).

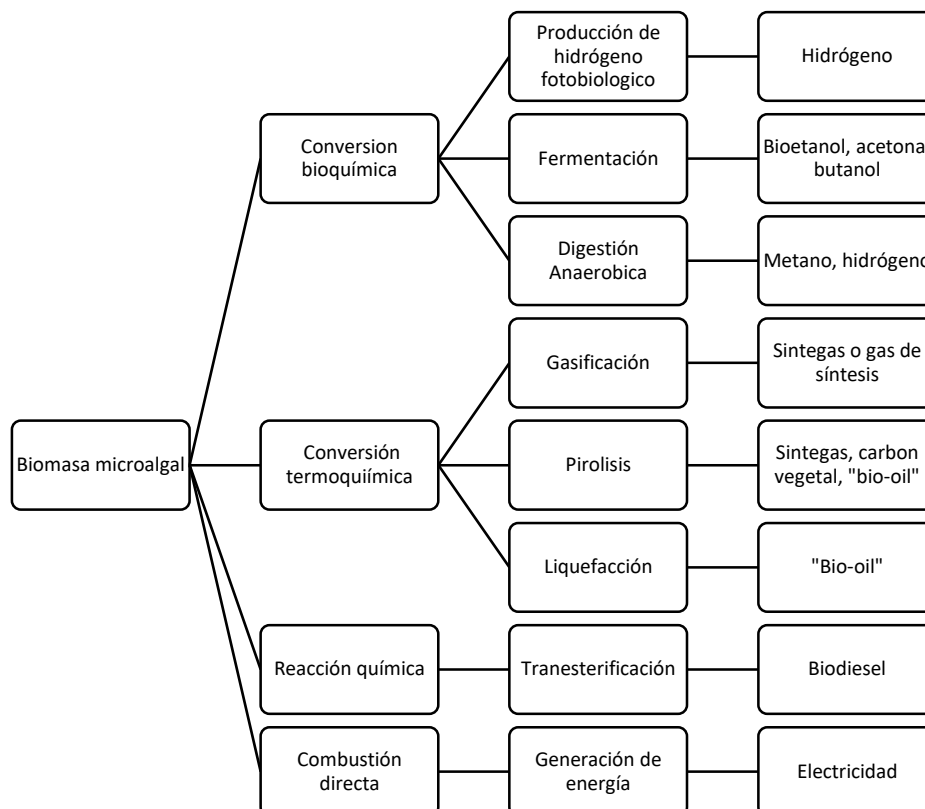
### **2.2.2 Clasificación de las microalgas**

Garibay A. (2009) asevera que la clasificación de microalgas se da bajo varios parámetros como la estructura celular, morfología, ciclo de vida y pigmentación. Varios autores han descrito clasificaciones de las microalgas. A continuación, se menciona las más significativas:

Las Chlorophytas, conocidas también como algas verdes, son microalgas que por lo general habitan en aguas dulces y ambientes terrestres. Las Rhodophytas también conocidas como algas rojas, por lo general habitan en aguas marinas. Las Heterokonphytas se dividen en diversas clases como las Crysophyceae o algas doradas que se encuentran en agua dulce o las Phaephyceae, Xantophyceae, Eutigmatophyceae. Las Bacillariophytas o diatomeas se encuentran en mayor cantidad en aguas marinas y en menor cantidad en aguas dulces y residuales. Finalmente, las cianobacterias son microorganismos similares a las bacterias debido a las similitudes de estructura y organización (Garibay-Hernández, Vázquez-Duhalt, Sánchez Saavedra, Serrano Carreón, & Martínez Jiménez, 2009; Gonzalez, 2016; Metting, 1996; Wehr, Sheath, & Kociolek, 2015)

### **2.3 Producción de biocombustibles a partir de microalgas**

Varios tipos de biocombustibles pueden ser producidos en base a las microalgas debido a la cantidad de sustancias que pueden almacenar en su interior. Existen varios tipos de modificación de la biomasa microalgal para la obtención de fuentes de energía que se encuentran clasificados en: conversión bioquímica y termoquímica, combustión directa y reacción química, tal como se aprecia en la figura 2 (Dragone, Fernandes, Vicente, & Teixeira, 2010).



*Figura 2.* Procesos de conversión de biomasa microalgal en biocombustibles. Adaptado de Dragone et al., 2010 .

Son varias las ventajas que presenta el uso de microalgas como materia prima para la elaboración de biocombustibles en comparación con plantas mayores: a) existe producción constante durante todo el año, b) utiliza menos agua en su crecimiento, a pesar de utilizar medios acuosos, c) elimina contaminantes del agua como el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^+$ ), fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), mercurio ( $\text{Hg}^{2-}$ ), entre otros, d) se puede usar espacios áridos para el cultivo de microalgas y así no compite con el uso de suelo fértil para la producción de alimentos, e) captación de gases tóxicos que van al ambiente como  $\text{CO}_2$  mediante la fotosíntesis (Dragone et al., 2010).

### 2.3.1 Producción de biodiesel a partir de distintos tipos de biomasa

Actualmente, se conoce que las microalgas son la materia prima ideal para la elaboración de biodiesel, sin embargo, tomó varios años las investigaciones para

llegar a esta conclusión debido a que primero se estudió otros tipos de materia prima como: la materia prima de primera generación que son cultivos agrícolas alimentarios, tales como la soya, la canola y el nabo, sin embargo, la cantidad de aceite que se genera con esta materia prima es baja en relación a la cantidad de espacio que ocupan los cultivos; la materia prima de segunda generación que son los residuos de productos agrícolas, asimismo, el rendimiento de producción de litros de aceite por hectárea del cultivo es bajo y presenta un elevado costo de purificación necesario para la obtención del producto final; y la materia prima de tercera generación que son las microalgas, no obstante, el rendimiento de producción de litros de aceite a base de microalgas por hectárea es alto en comparación con materia prima de primera y segunda generación tal como se indica en la tabla 1. Es decir, las microalgas son microorganismos que presentan un crecimiento acelerado en un espacio mucho más reducido (Antunes & Silva, 2010; Veillette, Chamoumi, Nikiema, Faucheux, & Heitz, 2012)

Tabla 1.

*Comparación de materias primas de biodiesel.*

Adaptado de Antunes & Silva, 2010

<b>Cultivo</b>	<b>Producción de aceite (L.ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Área cultivable necesaria (Mha)<sup>3</sup></b>
<b>Maíz</b>	172	1540
<b>Soya</b>	446	594
<b>Nabo</b>	1190	223
<b>Coco</b>	2689	99
<b>Aceite de Palma</b>	5950	45
<b>Microalgas (70% óleo/ peso seco)</b>	136900	2
<b>Microalgas (30% óleo/ peso seco)</b>	58700	4.5

Las investigaciones recientes de microalgas representan un grupo importante de microorganismos para la fabricación de biodiesel, porque la productividad de

obtención de aceite por hectárea es más alta comparada con otras fuentes (Tabla 1). Al ser organismos fotosintéticos, son capaces de transformar la luz obtenida en energía química, logrando que su crecimiento se complete en pocos días debido a que su estructura celular es simple. Además, al estar suspendidas en agua tienen mayor acceso a la misma, a CO<sub>2</sub> y a otros nutrientes (Demirbas & Demirbas, 2011; Dragone et al., 2010).

Las algas (macro y micro) son capaces de acumular lípidos precursores para la elaboración de biodiesel, como es el caso del triaciglicerol (TAG). Las células son capaces de producir TAG de la síntesis de *novo* de ácidos grasos en las estomas de los plástidos. Esta ruta metabólica utiliza ácidos grasos de cadenas entre 16 y 18 carbonos. El TAG se forma por la incorporación de ácidos grasos en la molécula de glicerol, este proceso tiene lugar en el retículo endoplasmático de los cloroplastos (Ferrell & Sarisky-Reed, 2010).

A continuación, se detallan las especies de microalgas que presentan un mayor porcentaje de contenido lipídico para la producción de biodiesel a escala industrial (Tabla 2).

Tabla 2.

*Microalgas de importancia lipídica para la elaboración de biodiesel*

Espece de microalga	Guo, Zhao, A, and Yang (2016)	Yan et al. (2014)	Song, Pei, Hu, and Ma (2013)	Chen et al. (2011)	Mutanda et al. (2011)
Contenido lipídico (%) en peso seco					
<i>Botryococcus braunii</i>	-	25 - 75	-	20,8	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	10-48	-	20	32-34	28-32
<i>Chlorella emersoni</i>	-	63	-	25-63	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	40,7- 63,2	20	21-58	19,2
<i>Neocloris oleoabundans</i>	40-65	35- 65	-	-	35-64



<b><i>Scenedesmus obliquus</i></b>	11-55	35-55	22	6,6 - 12,7	-
<b><i>Scenedesmus sp.</i></b>	-	9,5	25	40,8 - 54	19,6 - 21

## 2.4 Procesos upstream para la producción de biodiesel a partir de microalgas

El proceso upstream para la producción de biomasa microalgal consta de dos grandes segmentos: la bioprospección de microalgas y la obtención de biomasa microalgal.

### 2.4.1 Bioprospección de microalgas

La bioprospección de microalgas consta de cinco procedimientos para la obtención cepas de microalgas puras con interés biotecnológico. Los procedimientos son: la colecta de microalgas, aislamientos de microalgas, purificación de cepas, identificación y el mantenimiento de estas. Estos pasos se indican en la figura 3.

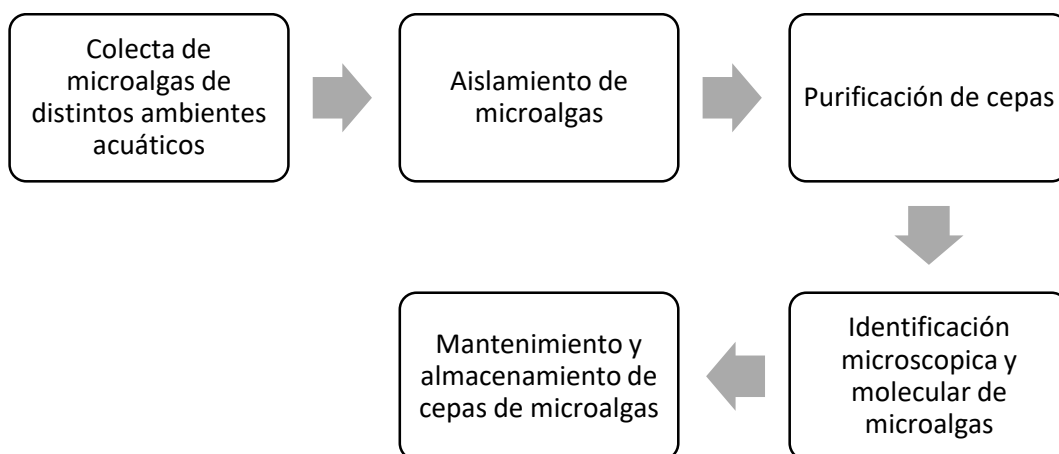


Figura 3. Bioprospección de microalgas.

Adaptado de Mutanda et al., 2011

Pasos a seguir para la obtención y almacenamiento de microalgas para la producción de biodiesel

#### **2.4.1.1 Colecta de microalgas de distintos ambientes acuáticos**

Las microalgas pueden estar presentes en distintos ambientes con características muy distintas; sin embargo, las microalgas productoras de lípidos para la generación de biodiesel están ubicadas en agua dulce, medios marinos y en medios salobres. Éste último medio es muy rico en nutrientes debido a la composición nutricional del sistema acuático y las temperaturas cálidas (Chisti, 2007). Mutanda et al (2011) aseveran que existen distintas metodologías para la colecta de muestras de microalgas, como el cepillado, el desagüe de las rocas o del fondo de los lugares donde se esté tomando la muestra. Para áreas con gran profundidad, se debe tomar muestras de aguas a distintas profundidades y con esto también se aísla el medio en el que habitan éstos microorganismos.

#### **2.4.1.2 Aislamientos de microalgas**

Para el aislamiento de microalgas se han desarrollado varios medios de cultivo aptos para el crecimiento de éstas en base al requerimiento nutricional que necesitan y con el fin de asemejar los nutrientes existentes en los diferentes hábitats. Los medios de cultivos difieren para las microalgas según su orden taxonómico y si son provenientes de agua dulce o marina. Entre los medios de cultivo más comunes encontramos: el Medio Bold Basal (BBM) que fue diseñado por Bold en 1949 y modificado en 1963, éste medio es ideal para microalgas de agua dulce en especial para Chlorophyceae, Xantophyceae, Chrysophyceae, y Cyanophyceae (Mutanda et al, 2011); otro medio de cultivo bastante usado es el medio BG-11 (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, & Stanier, 1979) el cuál es apto para microalgas de mar, agua dulce y de medios salobres (Barsanti & Gualtieri, 2014)

#### **2.4.1.3 Purificación de cepas**

Una vez que las microalgas se hayan desarrollados en dichos medios de cultivos deben ser purificadas, existen varias metodologías para éste procedimiento

como el micro pipeteo, purificación mediante platos de agar, separación gravimétrica, técnicas de solución, entre otras. La purificación se da debido a que muchas microalgas viven en consorcio y al ser sometidas a medios de cultivo se reproducen de la misma manera (Mutanda et al., 2011).

#### **2.4.1.4 Identificación microscópica y molecular de microalgas**

El proceso de identificación microscópica es mediante la morfología de las microalgas, con esto se pretende clasificar dentro del orden y familia al que pertenecen siguiendo claves taxonómicas establecidas; sin embargo, para poseer información más específica es necesario hacer estudios moleculares, con esto se tendrá la información necesaria de cualquier tipo de microalga. En el caso de bioprospección de microalgas para la producción de biodiesel se debe hacer estudios lipídicos a las mismas, con el fin de conocer si son productoras de TGA (Mutanda et al., 2011).

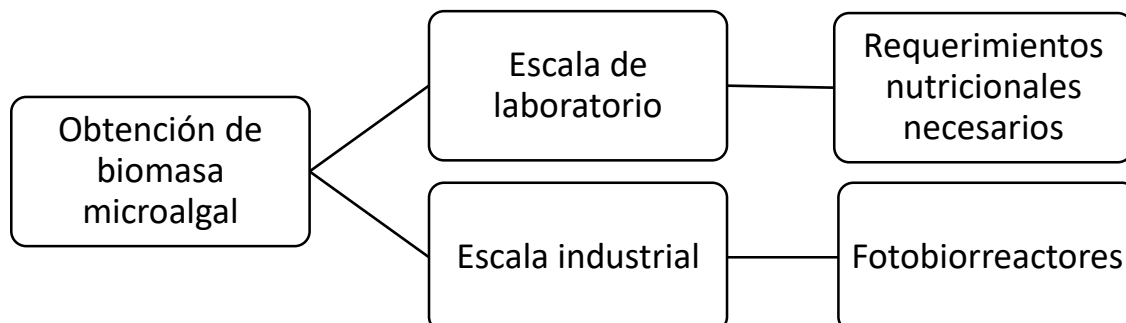
#### **2.4.1.5 Mantenimiento y almacenamiento de cepas de microalgas**

Se recomienda que las cepas aisladas y purificadas sean conservadas, sin embargo, éste proceso presenta varias limitaciones porque las microalgas al ser organismos vivos tienden a deteriorarse o morir en ambientes no adecuados, por lo que deben ser almacenadas en laboratorios bajo condiciones controladas sin perder su viabilidad y sin degenerarse (Mutanda et al., 2011).

#### **2.4.2 Obtención de biomasa microalgal**

Tras obtener cepas puras de microalgas, es preciso obtener biomasa para futuros estudios o aplicaciones. La obtención de biomasa se puede manejar a escala de laboratorio, la cual es ideal para la investigación; y a escala industrial al tener ya aplicaciones conocidas (Figura 4). En ambos casos se maneja parámetros de nutrición similares para los microorganismos, a base de Carbono,

Nitrógeno y Fósforo, pero también factores externos como la luz y temperatura juegan roles esenciales.



*Figura 4:* Obtención de biomasa algal.

a) La obtención de biomasa microalgal se puede dar a escala de laboratorio (ideal para investigaciones) y a escala industrial (ideal para elaboración de productos)

#### **2.4.2.1 Obtención de biomasa a escala de laboratorio: parámetros importantes**

Esta obtención de biomasa se da en ambientes más controlados, se provee a microalgas medios de cultivos desarrollados a base de las necesidades nutricionales de las mismas. Sin embargo, existen otros requerimientos que se deben controlar como:

##### **2.4.2.1.1 Luz**

Las microalgas son organismos fotosintéticos por lo que la luz es una de los parámetros más importantes a controlar en un cultivo de microalgas. La fotosíntesis es capaz de incrementarse a medida que la intensidad lumínica aumente hasta alcanzar la saturación por luz, pasada dicho punto la luz empieza a afectar a las células y se produce una foto inhibición que da como resultado el deterioro de las células hasta llegar a la muerte (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Por la tanto la producción de biomasa puede verse altamente afectada.

Es necesario considerar el fotoperiodo, cantidad y calidad de luz que se suministra a los cultivos de microalgas. Éstos factores variaran según la especie de microalga con la que se esté trabajando (Cabrera, 2016)

#### **2.4.2.1.2 Temperatura**

La temperatura juega un rol importante en los cultivos de microalgas, es capaz de influir en la velocidad de reacciones biocinéticas que realizan las células (Malgas, 2013). Las microalgas deben alcanzar una temperatura óptima para obtener una velocidad de crecimiento ideal. Hernandez-Pérez y Labbé (2014) afirman que la temperatura ideal de crecimiento está entre los 28° y 35°C, pero que esto puede variar según la especie con la que se trabaje. Si el cultivo microalgal sobrepasa la temperatura óptima, las células inhiben su crecimiento y su tiempo de vida disminuye. En cultivos cerrados y controlados se debe tener muy en cuenta este factor. En el caso de cultivos exteriores la evaporación del agua ayuda a que temperatura óptima se mantenga estable, sin embargo las fluctuaciones de calor en el día pueden afectar a las mismas (Malgas, 2013).

#### **2.4.2.1.3 pH**

El pH en los cultivos de microalgas también varía según la especie y así como otros parámetros tiene un punto óptimo. Para especies de agua dulce se debe trabajar con pH 8, fuera de este punto el crecimiento y productividad algal se ve afectada. La inyección de base o ácido a los cultivos es la forma más común de controlar el pH, sin embargo, la inyección de CO<sub>2</sub> con un sistema automatizado puede ser otra solución (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

#### **2.4.2.1.4 Nutrientes**

Los nutrientes inorgánicos para el crecimiento y producción de algas se los obtiene básicamente de medios de cultivos, los cuáles manejan nutrientes como:

- a) Carbono: la única fuente de carbono para microalgas foto autótrofas es el  $\text{CO}_2$ , el cual es incorporado a la biomasa mediante el ciclo de Calvin que realiza la misma. El suministro de  $\text{CO}_2$  debe ser directamente proporcional a la cantidad de biomasa que se genere en el cultivo, pues mientras más producción de biomasa se genere, la cantidad de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) en el ambiente también aumentará y la sobresaturación con  $\text{O}_2$  es perjudicial para los cultivos. Una vez fijado el carbono representa el 50% del peso seco de la biomasa (Fernandez, 2014; Hernández-Pérez & Labbé, 2014).
- b) Nitrógeno: las microalgas absorben el nitrógeno en forma de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ , en ambos casos la célula debe reducir estos compuestos hasta llegar a tener un grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) que son precursores de las proteínas. En peso seco el nitrógeno equivale al 5% de la biomasa. El  $\text{N}_2$  ayuda a regular la producción de lípidos en la célula, además, controlando el nivel de  $\text{N}_2$  en la célula se puede duplicar la cantidad de lípidos producidos por las microalgas (Fernandez, 2014; Hernández-Pérez & Labbé, 2014).
- c) Fósforo: se incorpora a las microalgas en forma de  $\text{HPO}_4^{2-}$  o  $\text{HPO}_4^-$  en varias estructuras importantes como los fosfolípidos, sin embargo, no necesita que se suministre en grandes cantidades. (Fernandez, 2014; Hernández-Pérez & Labbé, 2014).
- d) Micronutrientes: los nutrientes inorgánicos como manganeso, cobre, cobalto, zinc, entre otros; son denominados micronutrientes debido a que son necesarios en cantidades muy pequeñas. Son igual de importantes que otros nutrientes ya que actúan como cofactores de enzimas (Fernandez, 2014).

#### **2.4.2.2 Obtención de microalgas a escala industrial**

La obtención de grandes cantidades de biomasa requiere el uso de sistemas de cultivos capaces de almacenar altos volúmenes, bajo este parámetro existen los

fotobiorreactores. Éstos se rigen bajo las mismas necesidades de nutrientes que los sistemas de cultivos a escala de laboratorio, sin embargo, existen dos grandes grupos de fotobiorreactores: los de sistema abierto y los de sistema cerrado. Los fotobiorreactores de sistema abierto se encuentran en forma de piscinas o estanques tipo circuito (“raceways ponds”). Este tipo de fotobiorreactores utiliza la luz solar como fuente lumínica. Sin embargo, provoca que las condiciones de control de la temperatura y ph sean difíciles de manejar, también los cultivos corren un alto riesgo de contaminación (Fishman et al., 2010; Vélez Tamayo, 2014).

#### **2.4.2.2.1 Fotobiorreactores de sistema cerrado**

Los fotobiorreactores de sistema cerrado brindan mejores condiciones de crecimiento a las microalgas. Factores como la luz, el ph, y la temperatura del cultivo pueden ser controlados con facilidad, es decir las condiciones de cultivo presentan mayor reproducibilidad porque no depende de condiciones ambientales como en el caso de los sistemas abiertos (Vélez Tamayo, 2014). Al ser sistemas controlados, el riesgo de contaminación de los cultivos y la pérdida de agua por evaporación se disminuye notablemente. La utilización de sistemas cerrados presenta pérdidas mínimas de CO<sub>2</sub>. No obstante, el costo de mantenimiento y construcción es alto (Fishman et al., 2010). Chisti, (2007) sostiene que este tipo de fotobiorreactores permiten periodos de duración prolongados a cultivos puros, de una sola especie, y que la cantidad de biomasa que se genera es mayor en comparación con sistemas abiertos. Con la finalidad de captar la mayor cantidad de luz para el cultivo de microalgas existen fotobiorreactores de sistemas cerrados tubulares, de paneles planos y columnas de burbujeo.

- a) Los fotobiorreactores tubulares tienen un área de iluminación de gran superficie y una buena productividad de biomasa. Estos utilizan bombas *airlift* con el fin de prevenir que la biomasa se estanque. De todos los

sistemas cerrados, los costos de estos fotobiorreactores son los más bajos (Vélez Tamayo, 2014).

- b) Los fotobiorreactores planos tienen un área de iluminación mayor, debido a que una capa delgada pero muy densa de cultivo se mantiene entre las paredes transparentes del fotobiorreactor. Esto permite que haya una gran absorción de radiación que tiene como resultado una alta eficiencia fotosintética (Vélez Tamayo, 2014).
- c) Los fotobiorreactores de columna de burbujas se colocan verticalmente y reciben aireación desde el fondo. La iluminación también es absorbida mediante la utilización de paredes transparentes. Estos provocan que haya una mejor transferencia de gas y mejores condiciones de crecimiento controlables (Vélez Tamayo, 2014).

## **2.5 Proceso Downstream para la producción de biodiesel a partir de microalgas**

La biomasa obtenida en los fotobiorreactores, debe ser procesada hasta llegar a la producción de biodiesel. Estos procesos son: cosecha, ruptura celular, extracción lipídica y transesterificación; estos procedimientos son denominados procesos downstream.

### **2.5.1 Cosecha de biomasa**

La cosecha de la biomasa consiste en la separación de las microalgas y el agua presente en los cultivos. Existen sistemas físicos, químicos y biológicos que cumplen las mismas funciones de separación. La cosecha es importante dentro del proceso de producción de biodiesel ya que representa un alto porcentaje (20% a 30%) del costo final del producto (J. Ruiz et al., 2011). Las distintas técnicas que se utilizan para la cosecha de microalgas difieren según la especie con la que se trabaje porque se debe tener en cuenta factores como la densidad



del cultivo, el tamaño de las células, la aplicación final de la biomasa y el costo del proceso (Gerde, Yao, Lio, Wen, & Wang, 2014; Mata et al., 2010). Entre las distintas técnicas para la recolección de biomasa se encuentra:

#### **2.5.1.1 Floculación**

La floculación implica la unión de las células mediante la interacción de las cargas de los floculantes, la superficie acuosa y las microalgas, aumentando así la tasa de sedimentación de la biomasa. Existen dos tipos de floculantes: los orgánicos e inorgánicos. Los floculantes inorgánicos por lo general son sulfato de aluminio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ), sulfato férrico ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) y cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), mientras que entre los floculantes orgánicos se encuentran las poliacrilamidas y almidones catiónicos (Gerde et al., 2014). Existen métodos de floculación que no requieren la adición directa de floculantes, como es el control del pH del medio de cultivo microalgal, pero este procedimiento puede afectar a la célula (Cabrera, 2016)

#### **2.5.1.2 Filtración**

La filtración es el proceso por el cual el cultivo microalgal pasa por una membrana separando los líquidos y sólidos. Éste método es más eficaz en procesos con células grandes, como *Spirulina*, y poco efectivo para especies de menor dimensión, como *Chlorella* y *Scenedesmus* (Barros, Gonçalves, Simões, & Pires, 2015; Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

#### **2.5.1.3 Centrifugación**

La centrifugación es uno de los métodos más efectivos de cosecha de biomasa microalgal debido a la rapidez y eficacia de su funcionamiento, pero el costo de éste proceso es excesivo sobre todo para producciones industriales. Otro factor importante es que se pueden romper las células, deteriorando el producto final (Barros et al., 2015; Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

## **2.5.2 Ruptura celular**

La ruptura celular de microalgas para la producción de biodiesel no es reportada en todos los estudios, ya que se puede combinar con procedimientos de extracción lipídica directamente y trabajar sin una lisis celular previa. Sin embargo, es recomendable realizar una disrupción celular previa debido a que los lípidos se encuentran en el interior de la célula. Existen dos grandes grupos para la ruptura celular: los métodos mecánicos y no mecánicos.

### **2.5.2.1 Métodos mecánicos**

Existen varios métodos de lisis celular mecánicos aplicados para microalgas como: ultrasonificación, bead mealing, homogenización de alta temperatura y de velocidad.

#### **2.5.2.1.1 Microondas**

Las microondas son capaces de generar calor y aumentar la presión de las soluciones acuosas donde se encuentren suspendidas las microalgas, esto permite el fraccionamiento de la membrana celular permitiendo la exposición de los metabolitos intracelulares (Gunerken et al., 2015).

### **2.5.2.2 Métodos no mecánicos**

Este tipo de ruptura celular comprende agentes químicos y biológicos.

#### **2.5.2.2.1 Agentes químicos**

Existe una gran cantidad de químicos con los que se puede lograr la ruptura celular como: solventes, antibióticos, detergentes, ácidos, bases, entre otros. Todos actúan de manera diferente, por ejemplo: los antibióticos inhiben la

producción de ciertos componentes presentes en la membrana celular, los detergentes forman micelas con las membranas moleculares las cuales permiten la ruptura, los solventes perforan o disuelven la pared celular, las bases saponifican las membranas, mientras los ácidos perforan la pared celular (Gunerken et al., 2015).

#### **2.5.2.2.2 Agentes biológicos**

Se utiliza enzimas como agentes biológicos para la lisis celular, estas enzimas se unen a moléculas específicas de la pared celular hidrolizando los enlaces y degradando la pared celular. Para éste proceso son usadas enzimas como: glicosidasas, glucanasas, peptidasas y lipasas (Gunerken et al, 2015).

### **2.5.3 Extracción lipídica**

La extracción de lípidos es una de las etapas más importante del proceso para la producción de biodiesel. La clasificación de los métodos para la extracción de lípidos es: la extracción mecánica, química y biológica.

#### **2.5.3.1 Extracción mecánica**

Es uno de los métodos más convencionales, la biomasa sometida a este tipo de extracción puede ser reusada para más extracciones. Por otro lado, el aceite extraído mediante esta metodología necesita ser tratado en una refinería porque debe ser desgomado y filtrado (Atabani et al., 2012).

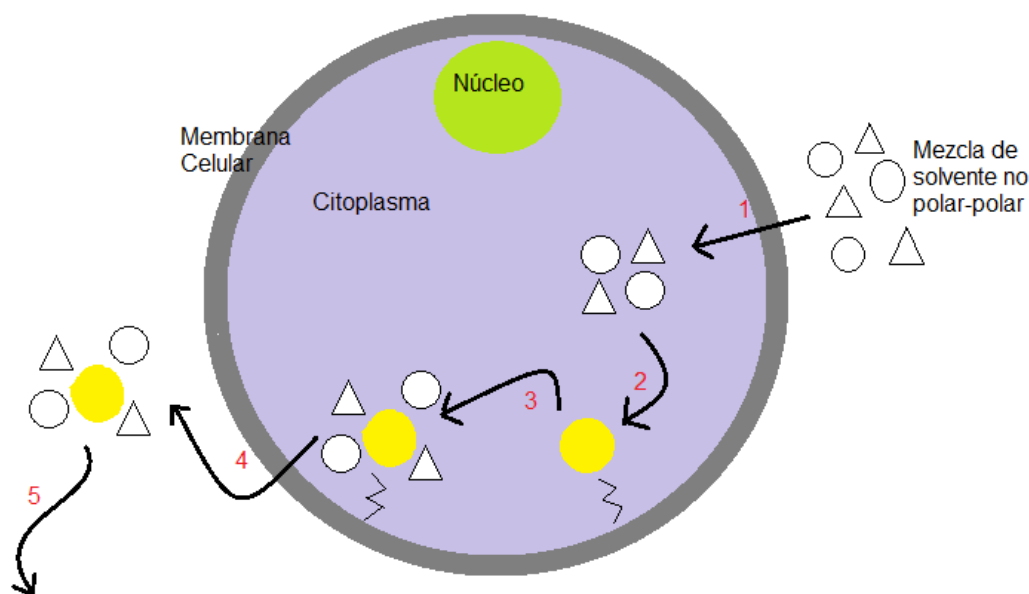
#### **2.5.3.2 Extracción química**

Este tipo de extracción utiliza solventes capaces de remover las grasas de las microalgas, así como también la clorofila. Varios factores condicionan la extracción química, como por ejemplo: el tamaño de partículas, el solvente escogido, la temperatura y la agitación que se maneja en el proceso. Entre los

problemas que presenta esta extracción se encuentra la contaminación que genera los solventes utilizados y el precio por extracción. Existen tres métodos para la extracción química que son: extracción por Soxhlet, ultrasonificación y extracción con agua (Atabani et al., 2012; Ronald Halim, Harun, Danquah, & Webley, 2012).

La extracción por Soxhlet se da mediante la ebullición y reflujo de solventes puros o mezcla de solventes orgánicos que se unen con los ácidos grasos de la muestra. Esta extracción se basa en el concepto de 'like dissolving like', el cual indica que se genera una interacción de 'Van del Waals' entre las cadenas hidrofóbicas de los distintos ácidos grasos presentes en la muestra. Las interacciones que se generan entre los solventes no polares (como hexano o cloroformo) y los lípidos neutros presentes en el interior de las células no genera la disrupción de la membrana celular debido a la composición química de la misma. Es por esta razón que se utiliza mezcla con solventes polares (como metanol, etanol e isopropanol) ya que estos son capaces de romper las interacciones de lípidos y proteínas mediante la formación de enlaces de hidrógenos con el complejo polar de los lípidos (R. Halim, Danquah, & Webley, 2012).

El proceso de extracción de las moléculas de ácidos grasos se puede dividir en 5 pasos, según R. Halim et al. (2012): 1) La mezcla de solventes orgánicos polar y no polar ingresa al citoplasma; 2) los solventes interactúan con los lípidos, el solvente no polar forma asociaciones de "Van Der Waals" con los lípidos neutros, mientras que el solvente orgánico polar rodea a los lípidos y forma enlaces de hidrógeno con los lípidos polares; 3) se forma un complejo entre los solventes y los lípidos; 4) el complejo recién formado atraviesa la membrana celular y 5) los lípidos intracelulares se liberan junto con los solventes (Figura 5).



*Figura 5.* Extracción química lipídica con mezcla de solventes polares y no polares.

Adaptado de Halim et al (2012).

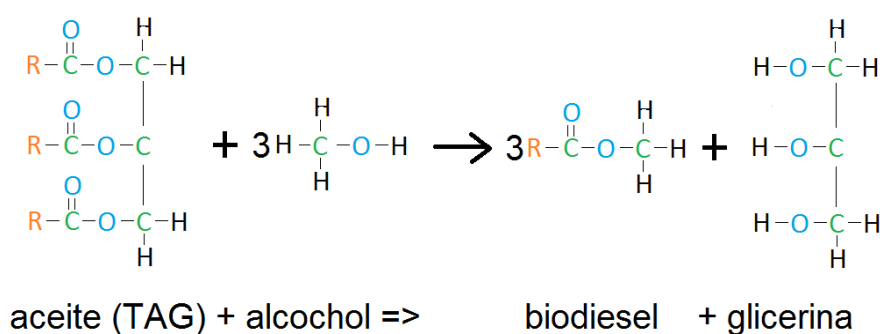
### 2.5.3.3 Extracción enzimática

Este método no emite productos volátiles al ambiente, no se genera agua residual y tampoco presenta impacto a la salud humana como es el caso en la extracción química. Por lo general, se usan enzimas como la proteasa alcalina para la extracción de lípidos, siendo más afectivo usarlas en medios acuosos. (Atabani et al., 2012).

### 2.5.4 Transesterificación

La elaboración de biodiesel se la realiza con una transesterificación. La transesterificación, es una reacción química que se da entre un alcohol que puede ser etanol, metanol o butanol con ácidos grasos. El ácido graso para la producción de biodiesel es el TAG debido a que produce alquil ésteres de ácidos grasos (Biodiesel) y glicerina (Figura 6). En ésta reacción influyen varios factores como: el tiempo, la temperatura, el catalizador que induce la reacción, la

concentración de ácidos grasos provenientes de la materia prima, entre otros. Por lo general, en la elaboración de biodiesel se utiliza la transesterificación, ya que presenta una velocidad de reacción alta y las condiciones para que la reacción suceda son sencillas en comparación con otro tipo de metodologías (Garibay, Vázquez-Duhalt, Sánchez, Serrano, & Martínez, 2010) (Chisti, 2007).



*Figura 6.* Reacción de transesterificación para la producción de Biodiesel.

Adaptado de Garibay, Vázquez-Duhalt, Sánchez, Serrano & Martínez, 2010

### 3 CAPITULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

Se determinó usar un diseño experimental en la extracción lipídica con la finalidad de evaluar que mezcla de solventes es la ideal para utilizar con la cepa seleccionada.

Por lo tanto, se analizaron dos mezclas de solventes para la de extracción lipídica de biomasa microalgal. Se denominó tratamiento 1 al ensayo en el que se utilizó la mezcla hexano-isopropanol con una relación volumétrica de 3:1 y tratamiento 2 al experimento en el cuál se utilizó la mezcla de hexano-etanol en relación 3:2.

#### 3.1 Método Estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar de dos variables. Las variables fueron el tratamiento 1 y el tratamiento 2. En ambos ensayos se realizó tres repeticiones

y se utilizó 20g de biomasa en cada prueba. La prueba de significancia se realizó con la prueba “t student”.

### **3.2 Hipótesis estadística**

Se planteó como hipótesis alternativa ( $H_1$ ) a la significancia de usar el tratamiento 1 o el tratamiento 2 en la extracción lipídica con el uso del soxhlet y como hipótesis nula ( $H_0$ ) a que no existe una diferencia significativa entre los dos tratamientos.

## **4 CAPITULO IV. PROCEDIMIENTOS**

### **4.1. Selección morfológica de cepas de microalgas ecuatorianas y reactivación en medios de cultivo**

Las cepas de microalgas seleccionadas para esta investigación corresponden a la Colección de Microalgas para Investigación de Ecuador (CMIE) perteneciente al Laboratorio de Biotecnología Energética, BIOTEC. La CMIE abarca microalgas colectadas y aisladas de diferentes sistemas lacustres de áreas protegidas de la Sierra y Amazonía del país con el permiso de investigación No. 002-14 IC-MC-DNB/MA emitido por el Ministerio del Ambiente Ecuador (MAE) y el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos No. MAE-DNB-CM-2015-0012.

El criterio de selección de cepas de microalgas se realizó según la morfología por microscopía en el laboratorio y por la bibliografía reportada como microalgas mayores productoras de lípidos; a partir de estos criterios se estableció características para la selección como: tamaño celular, forma celular y vesículas lipídicas microscópicamente visibles.

Se seleccionaron 14 cepas de microalgas nativas ecuatorianas conservadas de la CMIE que presentaron una morfología similar a especies de microalgas

productoras de TGA. En la Tabla 3 se indica el código que utiliza el BIOTEC para la identificación de las cepas, el origen de cada una de ellas y el medio de cultivo en el cual se hizo la reactivación celular.

*Tabla 3.*

*Cepas seleccionadas*

<b>N. de Cepa</b>	<b>Identificación de las cepas conservadas en BIOTEC</b>	<b>Origen de la cepa conservada</b>	<b>Medio de Cultivo</b>
1	CMIE-A1-001	Parque Nacional Cotopaxi, laguna de Santo Domingo, cepa 1	BBM
2	CMIE-A1-004	Parque Nacional Cotopaxi, laguna de Santo Domingo, cepa 4	BG-11
3	CMIE-A1-006	Parque Nacional Cotopaxi de la laguna de Santo Domingo, cepa 6	BG-11
4	CMIE-A3-001	Parque Nacional Cotopaxi de la laguna el Manantial , cepa 1	BG-11
5	CMIE-A3-011	Parque Nacional Cotopaxi de la laguna el Manantial , cepa 11	BG-11
6	CMIE-B2-001	Reserva Ecológica Antisana de la laguna La Mica, cepa 1	BBM
7	CMIE-B2-009	Reserva Ecológica Antisana de la laguna La Mica, cepa 9	BG-11
8	CMIE-D4-005	Reserva Cayambe- Coca de lago Sucus, cepa 5	BG-11
9	CMIE-D6-006	Reserva Cayambe- Coca del riachuelo Oyacachi, cepa 6	BBM
10	CMIE-E2-002	Reserva El Angel, del riachuelo El Angel, cepa 2	BG-11
11	CMIE-F1-003	Reserva Cotacachi- Cayapas del lago el Salado, cepa 3	BBM



<b>12</b>	CMIE-H2-001	Parque Nacional Sangay del lago Kuyuk, cepa 1	BG-11
<b>13</b>	CMIE-H2-002	Parque Nacional Sangay del lago Kuyuk, cepa 2	BG-11
<b>14</b>	CMIE-J1-003	Parque Nacional Yasuní del río Tiputini, cepa 3	BBM

Nota: Número de cepas seleccionadas para ésta investigación, identificación de las cepas en el BIOTEC y origen de las mismas

Las cepas de microalgas de la CMIE no han sido identificadas por su género y especie a nivel molecular. Sin embargo, por la morfología que presenta cada una de las cepas seleccionadas se determinó que son de los géneros *Chlorococcum* sp. y *Scenedesmus* sp.

Se siguió protocolo de reactivación celular de microalgas establecido por el BIOTEC modificado del procedimiento de UTEX (2017), las cepas de microalgas seleccionadas que son conservadas a una temperatura de -4 °C fueron colocadas a temperatura ambiente durante una hora. Se prepararon medios de cultivo BG-11 (Rippka et al., 1979) (Anexo 1) y Bold's Basal (BBM) (Bischoff & Bold, 1963) (Anexo 2) con un pH entre 6,6 y 7. Estos medios de cultivo fueron esterilizados a 121 °C y 104kPa durante 15 minutos en el autoclave marca LDZX Series Electric Pressure Steam Sterilizer modelo LDZX-50B. Posteriormente, se inoculó 20 uL de la solución de microalgas conservadas en 15 mL de medio de cultivo y fueron almacenados en tubos Falcon de 50 mL. Estos cultivos fueron expuestos a luz artificial a un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Durante el crecimiento, la cantidad de luz fue controlada con el luxómetro Digital Lux Meter de HoldPeak, modelo HP-881A. La cantidad de luz se mantuvo estable a 664 luxes. La reactivación se realizó durante 50 días bajo las condiciones previamente mencionadas.

## 4.2. Escalamiento de cepas

### 4.2.1 Escalamiento a nivel de laboratorio

El escalamiento a nivel de laboratorio se realizó solamente a las cepas que presentaron una reactivación celular efectiva, es decir, que después de los 50 días de cultivo presentaron una concentración celular mayor a  $1 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>.

El volumen inicial para el escalamiento fue de 200 mL de medio de cultivo correspondiente para cada cepa en frascos de vidrio autoclavados. La concentración inicial para cada escalamiento fue de  $1 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>, para determinar el volumen necesario del inóculo se ocupó la siguiente formula:

$$V.inóculo = \frac{V\ final * 1 \times 10^6}{DC\ inóculo} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Tomado de (Bastidas, 2008)

Donde V. inóculo es el volumen que se utilizará del inóculo, V final es el volumen final al que se llegó en cada escalamiento y DC inóculo es la densidad celular del inóculo.

Los cultivos fueron incubados hasta obtener una concentración final de  $1 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, se aumentó la escala hasta llegar a un volumen de 5000mL. Las concentraciones iniciales y finales fueron las mismas en todos los volúmenes ocupados (Tabla 4).

Tabla 4.

*Niveles de escalamiento a nivel de laboratorio y en fotobiorreactores tubulares.*

Nivel de Escalamiento (L)	Volumen del inóculo (L)	Concentración inicial (cel.mL <sup>-1</sup> )	Concentración Final (cel.mL <sup>-1</sup> )
0,2	0,02	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
0,5	0,05	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
1	0,1	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$

2	0,2	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
5	0,5	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
10	1	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
20	2	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
40	4	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$

Los cultivos se mantuvieron con aeración constante con bombas de aire acuáticas JAD® y se suministró CO<sub>2</sub> a una presión de 500 PSI cada 72 horas. Los tiempos determinados para suministrar CO<sub>2</sub> a los cultivos fueron establecidos por el BIOTEC y se indican en la tabla 5.

Tabla 5.

*Tiempo de suministro de CO<sub>2</sub> según el nivel de escalamiento*

<b>Nivel de Escalamiento (L)</b>	<b>Suministro de CO<sub>2</sub> (min)</b>
0,2	-
0,5	-
1	2
2	2
5	3
10	5
20	7
40	8

#### **4.2.2 Escalamiento a nivel piloto en fotobiorreactores**

Los fotobiorreactores tubulares fueron elaborados según el prototipo que se ocupa en BIOTEC, estos se construyeron con polietileno de 2.20 m de largo x 50 cm de ancho y fueron colocados en forma de “V” al aire libre. Poseen dos aberturas en la parte superior que permite que los reactores tengan un flujo de aire mediante la bomba de presión. Presentan una válvula en la parte inferior

que permite la cosecha una vez culminado el crecimiento. Los fotobiorreactores son capaces de almacenar hasta 40 L de cultivo de microalgas.

La primera inoculación se realizó con un volumen de 10 L de medio de agua potable y Nitrofoska® foliar (NPK) (Cabrera, 2016; Paez, 2016) (medio NPK) (Anexo 3) con una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup>, se administró CO<sub>2</sub> durante 8 minutos cada 48 horas, el crecimiento se dio por 20 días hasta obtener una concentración final de  $1 \times 10^7$  cel·mL<sup>-1</sup> y se escaló a un volumen de 40L.

### **4.3. Cosecha y Secado de la biomasa microalgal**

#### **4.3.1 Floculación de biomasa**

La biomasa microalgal fue cosechada después de que esta alcanzó una concentración final de  $1 \times 10^7$  cel·mL<sup>-1</sup>. Se recolectó todo el volumen de los fotobiorreactores en tanques de 10 y 15 L. A continuación, se agregó 1 g·L<sup>-1</sup> de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> a la biomasa recolectada y se agitó durante cinco minutos. Los cultivos se dejaron en reposo durante 24 horas con la finalidad de que la biomasa flocule y se retiró el excedente de agua con un sistema de succión. Posteriormente, la biomasa fue filtrada al pasar por un geotextil (Cabrera, 2016; Paez, 2016).

#### **4.3.2 Secado de biomasa floculada**

La biomasa obtenida fue secada a temperatura ambiente en un secador solar diseñado por BIOTEC. Para finalizar el secado se utilizó una estufa, marca ECOCELL, modelo LSIS-B2V / EC 55. El programa de secado de la estufa consta de 3 fases:

- a) Temperatura para iniciar: 1 minuto.
- b) Temperatura de cámara: 40 minutos aproximadamente.
- c) Temperatura de secado: 15 minutos a 90° C.

Finalmente se pesó el total de biomasa seca obtenida en una balanza analítica marca Boeco ® modelo BAS31 plus.

#### 4.4 Análisis de grasas totales

El análisis de grasas se realizó en el laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador. El método utilizado para este análisis fue AOAC 991.36. Este método también es conocido como método Randall el cual disuelve sustancias mediante la inmersión de la muestras en disolventes en ebullición (Randall, 1974) (Anexo 4).

#### 4.5 Evaluación del crecimiento de cepas de microalgas

##### 4.5.1 Determinación de curva de crecimiento

Se realizó la curva de crecimiento de la cepa seleccionada con el mayor porcentaje de grasas totales. El inóculo inicial del cultivo para la determinación de la curva de crecimiento fue de  $1 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup>, los conteos celulares se realizaron cada 72 horas durante 30 días en la cámara de Neubauer. A partir de la tercera semana se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 para facilitar el conteo con la cámara de Neubauer en el microscopio. Los conteos se efectuaron en los cuatro cuadrantes por duplicado y se calculó la densidad celular con la siguiente fórmula:

$$DC = N * 10^4 * (F.d) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Tomado de (Guillard, 1973)

En donde DC es la densidad celular, N es el promedio de células presente en 1 cm<sup>3</sup>, F.d es el factor de dilución que se ocupó.

##### 4.5.2 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación celular

Para el cálculo de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) se ocupó la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\ln(X_2/X_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Tomado de Lobban, Chapman & Klemaer, 1998

Donde  $X_1$  y  $X_2$  corresponden a dos puntos dentro del crecimiento microalgal siendo  $X_1$  el menor y  $X_2$  el inmediato superior,  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos que corresponden para  $X_1$  y  $X_2$ .

Después de la obtención de la velocidad de crecimiento, el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) fue calculado con la siguiente formula:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Tomado de Lobban, Chapman & Klemaer, 1998

#### 4.6 Lisis celular

Después de la obtención de la biomasa húmeda se procedió al rompimiento celular utilizando dos metodologías:

Se realizó un lavado de la biomasa con agua destilada esterilizada para eliminar residuos  $Al_2(SO_4)_3$  de la biomasa húmeda. Se realizó un choque osmótico donde una solución de cloruro de sodio (NaCl) fue preparada a una concentración de 1M. La biomasa microalgal fue colocada dentro de ésta solución y se dejó en reposo durante 72 horas. Tras haber transcurrido los tres días se retiró el excedente de la solución (Lee et al., 2010).

Se siguió la metodología descrita por Lee et al, (2010), por lo tanto, se midió 200mL de agua destilada por cada gramo de biomasa y homogenizó durante 1 min. Ésta solución fue sometida a microondas (GoldStar, modelo MA-1197M) durante 5 minutos a una potencia de 2450 MHz. Después de haber realizado el rompimiento celular se secó toda la biomasa (Pohndorf et al., 2016).

#### **4.7 Extracción lipídica**

La biomasa seca fue pulverizada mediante la ayuda de un mortero. Posteriormente, se pesó 20 g de biomasa y se colocó en los capuchones que se introdujeron en el tubo de muestras del soxhlet. Paralelamente, dos soluciones stock de alcoholes fueron preparadas: la primera fue de hexano-isopropanol en una relación 3:1 según indica la metodología descrita en (Lee et al., 2010) y la segunda fue de hexano-etanol en una relación 3:2 (R. Halim et al., 2012). Las soluciones de alcoholes se colocaron en los tubos de muestra del soxhlet junto con la biomasa seca y se elevó la temperatura hasta el punto de ebullición de los alcoholes (80 °C) durante 3h. Consecutivamente, se dejó enfriar el equipo durante 15 min y el aceite obtenido se colocó en tubos de ensayo (Ramluckan, Moodley, & Bux, 2014) . Se pesó las muestras de aceite obtenidas con la balanza analítica de marca Shimadzu modelo ATX224 y se determinó la densidad de la muestra.

#### **4.8 Análisis de perfil lipídico**

El análisis de grasas se realizó en el laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador. El método utilizado para este análisis fue MAL-03/AOAC 991.36. Este método también es conocido como cromatografía de gases en donde la muestra es volatilizada y colocada en una columna cromatográfica. (Anexo 5).

#### **4.9 Análisis Estadístico**

Se realizó un diseño experimental completamente al azar de un factor, para determinar con que mezcla de solvente existe una mejor extracción de lípidos. La hipótesis nula de este análisis fue la inexistencia de una diferencia significativa entre los dos tratamientos. El volumen de aceite microalgal obtenido en cada una de las pruebas se utilizó para correr la prueba T student en el Software IBM SPSS versión 24.

#### 4.10 Transesterificación

Para la reacción de transesterificación o alcoholisis (Figura 5), el aceite microalgal se calentó a baño maría hasta que alcanzó a una temperatura entre 70 y 80°C. Se disolvió el catalizador, hidróxido de potasio (KOH), en metanol en una relación 1% p.p<sup>-1</sup> con el peso del aceite obtenido de microalgas y se agregó al aceite. La mezcla se mantuvo en agitación constante de 400 rpm. (Moreno, Kafarov, & Plata, 2009). Se dejó en reposo durante 24 horas con la finalidad de que el biodiesel y la glicerina (coproducto) se separe. Transcurridas las 24 horas, se observó las fases que generan después de la transesterificación con la finalidad de determinar si la reacción tuvo éxito. Posteriormente, se determinó el pH del biodiesel obtenido con una ph-metro marca PCTertr modelo 35.

Se calculó la productividad de la reacción en donde se tomó en cuenta el volumen inicial de aceite microalgal y el volumen final de biodiesel obtenido después de la reacción de transesterificación (Ecuación 5).

$$P\% = \frac{V_f}{V_o} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 5})$$

En donde P% es la productividad final que se obtuvo, Vf es el volumen de biodiesel obtenido (ml) y Vo es el volumen inicial del aceite microalgal.

### 5. CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Selección morfológica de cepas de microalgas ecuatorianas y reactivación en medios de cultivo

Las cepas escogidas fueron aquellas con mayor concentración celular después de su reactivación a los 50 días de cultivo en 15 mL de medio BG-11 y BBM. En la tabla 6 se presenta la concentración celular de las cepas a los 50 días de cultivo y el resultado de la reactivación celular.



Tabla 6.

*Reactivación celular*

<b>N. de Cepa</b>	<b>Concentración celular en el medio de cultivo (cel·mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Reactivación celular</b>
<b>1</b>	1,06 x10 <sup>5</sup>	Si
<b>2</b>	0,98 x10 <sup>4</sup>	No
<b>3</b>	No hubo crecimiento	No
<b>4</b>	2,09x10 <sup>5</sup>	Si
<b>5</b>	No hubo crecimiento	No
<b>6</b>	2,24x10 <sup>7</sup>	Si
<b>7</b>	1,73x10 <sup>5</sup>	Si
<b>8</b>	1,21x10 <sup>6</sup>	Si
<b>9</b>	1,87 x10 <sup>6</sup>	Si
<b>10</b>	1,93 x10 <sup>5</sup>	Si
<b>11</b>	2,09 x10 <sup>5</sup>	Si
<b>12</b>	1,69 x10 <sup>5</sup>	Si
<b>13</b>	1,05 x10 <sup>7</sup>	Si
<b>14</b>	No hubo crecimiento	No

Nota: Se presenta las cepas que fueron reactivas de las 14 escogidas según la concentración celular que hubo en el medio a los 50 días de cultivo.

La reactivación celular de las microalgas tuvo una duración de 50 días debido a que se utilizaron inóculos de cepas conservadas en una concentración inferior a 1x10<sup>3</sup> cel.mL<sup>-1</sup>. Al finalizar el período de reactivación celular, se obtuvieron cepas de microalgas viables que presentaron valores de concentración superiores a 1x10<sup>5</sup> cel.mL<sup>-1</sup>, mientras que otras cepas, no lograron responder al proceso de adaptación y no hubo crecimiento celular en el tiempo establecido. No se reportan casos de reactivación celular de microalgas conservadas y congeladas con datos de concentración inicial para ninguna de las especies con las que se trabajó (*Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp.).

Por otro lado, la metodología usada por el BIOTEC de crio conservación celular de microalgas es una modificación de la metodología descrita por UTEX (2017), la cual asegura un alto porcentaje de recuperación celular. Sin embargo, en este estudio se obtuvo una eficiencia de reactivación del 71,43%, lo que permite inferir que hubo una alta tasa de reactivación celular.

## 5.2 Escalamiento de cepas

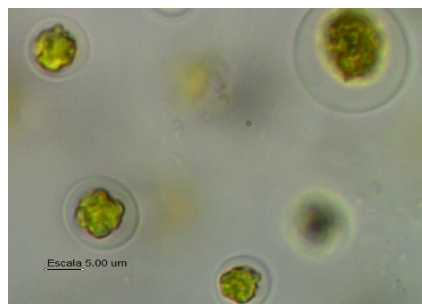
### 5.2.1 Escalamiento a nivel de laboratorio

Las cepas reactivadas respondieron a un crecimiento exponencial característico de las microalgas sin presentar contaminación. El tamaño de las microalgas activadas oscila aproximadamente entre 5 y 15  $\mu\text{m}$  y las imágenes de estas fueron obtenidas a partir de la observación en microscopio en un enfoque 100X (Figura 7) (Tabla 7).

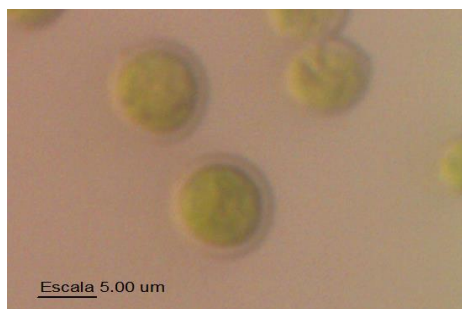
a)



f)

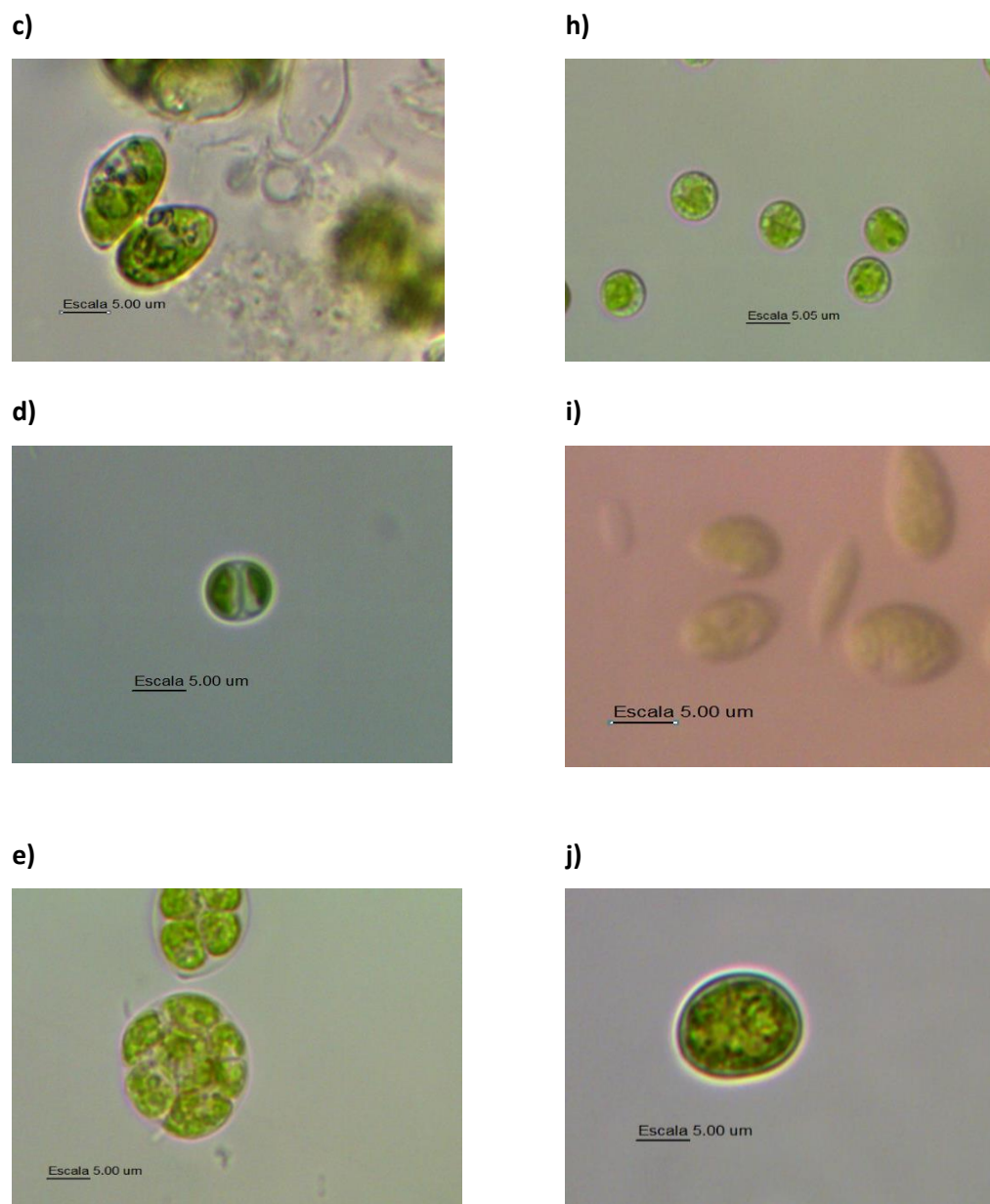


b)



g)





**Figura 7.** Micrografías de cepas activadas.

- a) Cepa 1 correspondiente al género *Scenedesmus*.
- b) Cepa 4 correspondiente al género *Chlorococcum*.
- c) Cepa 6 correspondiente al género *Scenedesmus*.
- d) Cepa 7 correspondiente al género *Chlorococcum*.
- e) Cepa 8 correspondiente al género *Chlorococcum*.
- f) Cepa 9 correspondiente al género *Chlorococcum*.
- g) Cepa 10 correspondiente al género *Chlorococcum*.
- h) Cepa 11 correspondiente al género *Chlorococcum*.
- i) Cepa 12 correspondiente al género *Scenedesmus*.
- j) Cepa 13 correspondiente al género *Chlorococcum*.

Tabla 7.

*Tamaño celular*

No. De Cepa	Tamaño de célula Largo (um)	Tamaño de célula Largo (um)
1	9,13	7,56
4	7,60	6,68
6	10,61	6,67
7	4,74	5,58
8	15,36	14,21
9	9,38	9,57
10	8,37	9,31
11	4,60	4,74
12	7,47	4,92
13	8,88	10,89

Nota: Tamaño celular de las cepas reactivadas en proceso de escalamiento a nivel de laboratorio

Varias investigaciones reportan que la concentración celular inicial del cultivo debe ser igual o superior a  $1 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup>, en el caso de escalamiento de cepas de microalgas, tal como se trabajó en esta investigación (Bermúdez, Lodeiros, & Morales, 2002; Tang et al., 2017; Xin, Hu, Ke, & Sun, 2010). Las células después de ser inoculadas, comienzan la fase lag en dónde se adaptan al medio para su posterior desarrollo y multiplicación celular.

Durante el proceso de escalamiento, la pureza de las cepas fue controlada mediante la visualización de las células en el microscopio con un enfoque de 100X. Conjuntamente, el tamaño celular de cada cepa fue medido y se puede observar que los tamaño de las células de microalgas con las que se trabajó en esta investigación varían entre 5 y 10 um por célula. La colección de cultivos autótrofos (CCALA, siglas en inglés) que pertenece al Instituto de Botánica CAS reporta que el tamaño del diámetro celular para *Chlorococcum* spp. varía entre 10 y 15 um, mientras que el tamaño para *Scenedesmus* sp. se encuentra entre 5 y 10 um; por lo que se puede inferir que el tamaño del diámetro de las células con las que se trabajó en esta investigación se encuentran cerca de la media que es reportada por CCALA.

### 5.2.2 Escalamiento a nivel piloto en fotobiorreactores.

Las microalgas se adaptaron a la modificación del medio de cultivo esterilizado a medio NPK en los fotobiorreactores tubulares en forma de "V" (Figura 8). Sin embargo, la cepa 9 y 10 atenuaron su crecimiento en el nuevo medio hasta morir. En la Tabla 8 se presenta la concentración final de cada una de las cepas después de 15 días de cultivo a un volumen de 40L y previo a su cosecha.

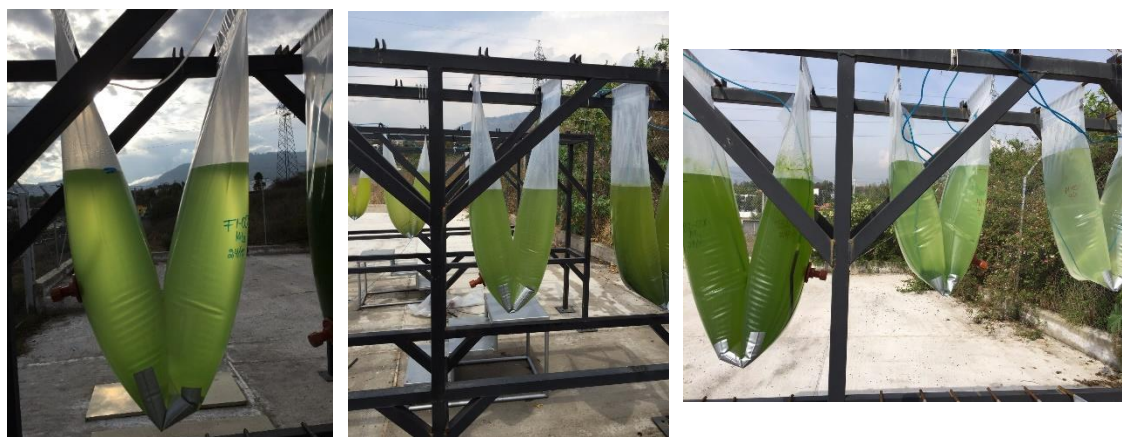


Figura 8. Fotobiorreactores tubulares en forma de "V" de 40L que contienen medio de cultivo NPK y microalgas.

Tabla 8.

Concentración final fotobiorreactores.

No. De Cepa	Concentración Final en fotobiorreactores de 40 L (cel·mL <sup>-1</sup> )
1	1,15 x10 <sup>7</sup>
4	1,06 x10 <sup>7</sup>
6	2,37 x10 <sup>7</sup>
7	1,30 x10 <sup>7</sup>
8	1,86 x10 <sup>7</sup>
9	-
10	-
11	1,14 x10 <sup>7</sup>
12	1,66 x10 <sup>7</sup>
13	1,92 x10 <sup>7</sup>

Nota: Concentración final de fotobiorreactores tubulares de 40L a los 15 días de cultivo previo a la cosecha

Ocho de diez cepas de microalgas utilizadas en esta investigación lograron adaptarse al medio NPK en fotobiorreactores tubulares en forma de "V" hasta alcanzar concentraciones superiores a  $1 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> en 15 días de cultivo. Estudios realizados con microalgas nativas en el BIOTEC arrojan resultados similares ya que se ha determinado que las especies como *Chorococcum* sp., *Chorella* sp. y *Scenedesmus* sp. se adaptaron fácilmente a medio NPK (Cabrera, 2016; Cargua, 2015; Paez, 2016). Además, Andrade, Vera, Cárdenas, and Morales (2009) reportan que *Scenedesmus* sp. también se adaptó a aguas residuales de pescadería como medio de cultivo. Estos reportes indican que las dos especies con las que se trabajó en esta investigación poseen buena adaptabilidad a diferentes medios alternativos.

Se puede inferir que varias especies de microalgas se adaptan a medios más simples y baratos debido a que estas habitan en diversos tipos de aguas, incluyendo aguas residuales las cuales presentan mayores niveles de contaminación de metales pesados como el mercurio, materia orgánica, entre otros (Chisti, 2007; Fishman et al., 2010; Mutanda et al., 2011). La adaptabilidad a medios de cultivo es un parámetro importante dentro de la producción de microalgas.

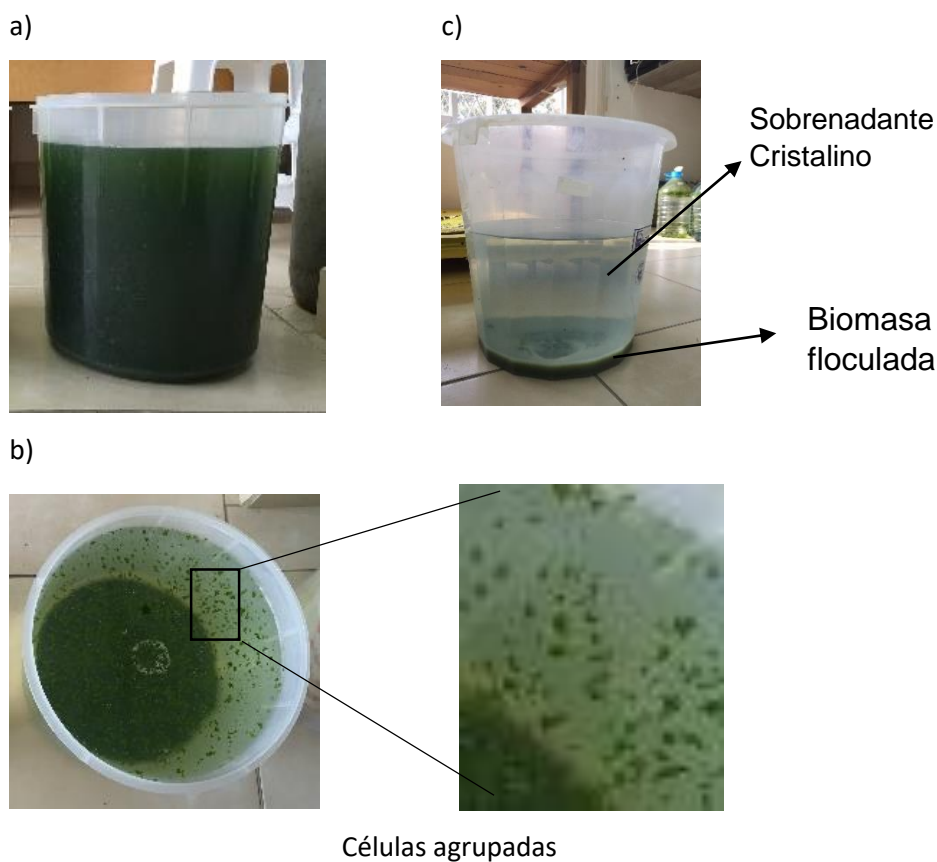
No obstante, el 20% de cepas de microalgas reactivadas no se adaptaron al medio de cultivo utilizado, probablemente debido a que la pureza y la cantidad de elementos como Calcio (Ca) y Sodio (Na) que se encontraban presentes en los medios BG-11 y BBM eran esenciales para su desarrollo y en el medio NPK no se encontraban presentes. Esto se debe a que estos medios de cultivo (BG-11 y BBM) fueron diseñados para el crecimiento óptimo de microalgas, mientras que el medio NPK es una adaptación debido a que la nitrofoska es un fertilizante vegetal que presenta los componentes esenciales para el crecimiento de microalgas (Barsanti & Gualtieri, 2014; Bischoff & Bold, 1963; Rippka et al., 1979).

Por otro lado, las concentraciones finales obtenidas en los fotobiorreactores de 40L para las microalgas reactivadas varían en 55,27% entre la cepa 4 y la cepa 6, debido a que se obtuvo  $1,06 \times 10^7$  cel.ml<sup>-1</sup> como la concentración mínima y  $2,37 \times 10^7$  cel.ml<sup>-1</sup> como la concentración máxima 6 después de 20 días de cultivo. Esto se puede contrastar con reportes en los que se obtiene una concentración de  $4,2 \times 10^7$  cel.ml<sup>-1</sup> después de 14 días de cultivo (Bermúdez et al., 2002), por lo que las cepas utilizadas en esta investigación tienen un crecimiento promedio.

### 5.3 Cosecha y Secado de la biomasa microalgal

#### 5.3.1 Floculación de biomasa

El proceso de la floculación de la biomasa se indica en la Figura 9 en donde se observa el medio de cultivo en los tanques, el proceso de la floculación y las microalgas floculadas previo a la remoción del medio NPK.



*Figura 9. Proceso de floculación.*

- a) Biomasa microalgal recolectada en tanques de 10 y 15 L.
- b) Proceso de floculación en curso.
- c) Biomasa floculada

La floculación realizada con  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  arrojó valores de peso seco que varían entre  $0,71\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $1,25\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  que representan una diferencia porcentual de 43,2% en referencia a la mínima y máxima concentración. El rango de concentración promedio se ajusta a lo reportado por Gerde et al. (2014) en donde se utilizó  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  como floculante y se obtuvo concentraciones de peso seco entre 0.93 a  $4.65\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Por otro lado, reportes como el de Gerde et al. (2014) y el de Rashid, Rehman, Sadiq, Mahmood, and Han (2014) indican que el uso de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  como floculante para microalgas presenta eficiencias porcentuales mayores a 90%. Sin embargo, la eficiencia del uso de floculantes varía según la especie de microalga y la concentración celular en el momento de la floculación. Asimismo, existen metodologías que alcanzan eficiencias superiores al 99% como es el caso de la electrocoagulación, en donde los valores de concentración de biomasa superan  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Uduman, Qi, Danquah, & Hoadley, 2010).

La densidad microalgal presente en los ensayos previo a la floculación de las células se mantuvieron en concentraciones de  $1,06\times 10^7$  a  $2,37\times 10^7\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  para el mínimo y máximo respectivamente. Esta concentración está por debajo de la indicada en el reporte de Rojo-Cebreros, Morales-Plascencia, Ibarra-Castro, Martínez-Brown, and Medina-Jasso (2016), en donde la microalga *Nannochloropsis* sp. fue floculada en concentraciones de entre 5,2 y  $5,5 \times 10^7\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  con hidróxido de sodio a 0,5N. Este reporte indica que hay una relación directamente proporcional entre la densidad celular y la eficiencia de floculación, que se también se evidencia en esta investigación ya que la máxima concentración que se obtuvo al momento de la floculación fue de la cepa 6 con  $2,37\times 10^7\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  y también obtuvo el mayor valor de peso seco que fue de  $1,25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que la cepa 4 presentó una concentración de  $1,06\times 10^7\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  y obtuvo un peso seco de  $0,84\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



### 5.3.2 Secado de biomasa floculada

El valor máximo y mínimo obtenido en el secado de biomasa floculada en 40 L de cultivo fue de 1,25 g·L<sup>-1</sup> para la cepa 6 y 0.71 g·L<sup>-1</sup> para la cepa 1 respectivamente. Después de haber obtenido el peso seco, se calculó la productividad del mismo tomando en cuenta que el tiempo de cultivo fue de 15 días (Tabla 9).

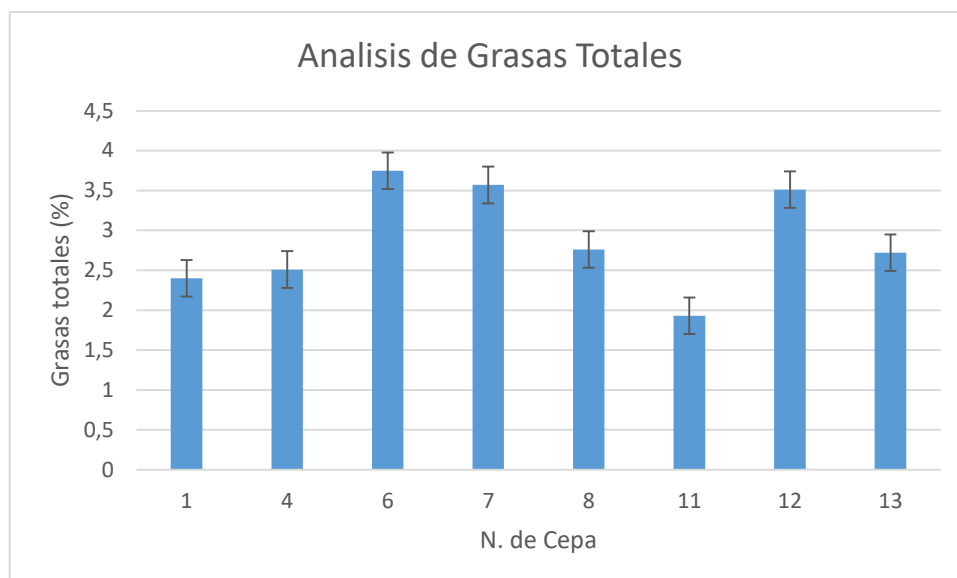
Tabla 9.

*Peso seco de las cepas seleccionadas y productividad de la obtención de biomasa seca.*

N. de Cepa	Peso seco (g·L <sup>-1</sup> )	Productividad (g·L <sup>-1</sup> ·día <sup>-1</sup> )
1	0,71	0,05
4	0,84	0,06
6	1,25	0,08
7	1,13	0,08
8	0,92	0,06
11	1,03	0,07
12	1,08	0,07
13	0,95	0,06

### 5.4 Análisis de Grasas totales

El análisis de grasas de la biomasa de cada una de las cepas seleccionadas indicó que la microalga con mayor producción lipídica fue la cepa 6 con 3.75% de grasa en peso seco, mientras que se cuantificó valores entre 1.93 y 3.57 % de grasa en peso seco para el resto de cepas (Figura 10) (Anexo 6).



**Figura 10.** Análisis de Grasas Totales

a) Porcentaje de grasas totales presentes en la biomasa seca microalgal. Análisis realizados en el laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central.

En el análisis de grasas de la biomasa seca de cada cepa se obtuvieron valores porcentuales de contenido lipídico que varían entre 1.93 y 3.57%, siendo la cepa 6 con mayor contenido de grasas totales. Estos valores son bajos en comparación a los reportados en Chisti (2007) en donde se registra microalgas con un contenido lipídico entre 15% y 75% para las especies *Tetraselmis sueica* y *Botryococcus braunii* respectivamente. Por otro lado, varios reportes indican que el porcentaje de lípidos en peso seco para *Scenedesmus* sp. es muy variante. Por ejemplo, Gouveia Oliveira (2009) muestra que esta especie contiene un 9,5% de lípidos, mientras que Chen et al. (2011) afirma que el contenido de grasa para esta especie fluctúa entre 40,8 y 54%. Asimismo, los valores de contenido lipídico para *Chlorococcuom* sp. son mayores a 19,6% (Rodolfi et al., 2009).

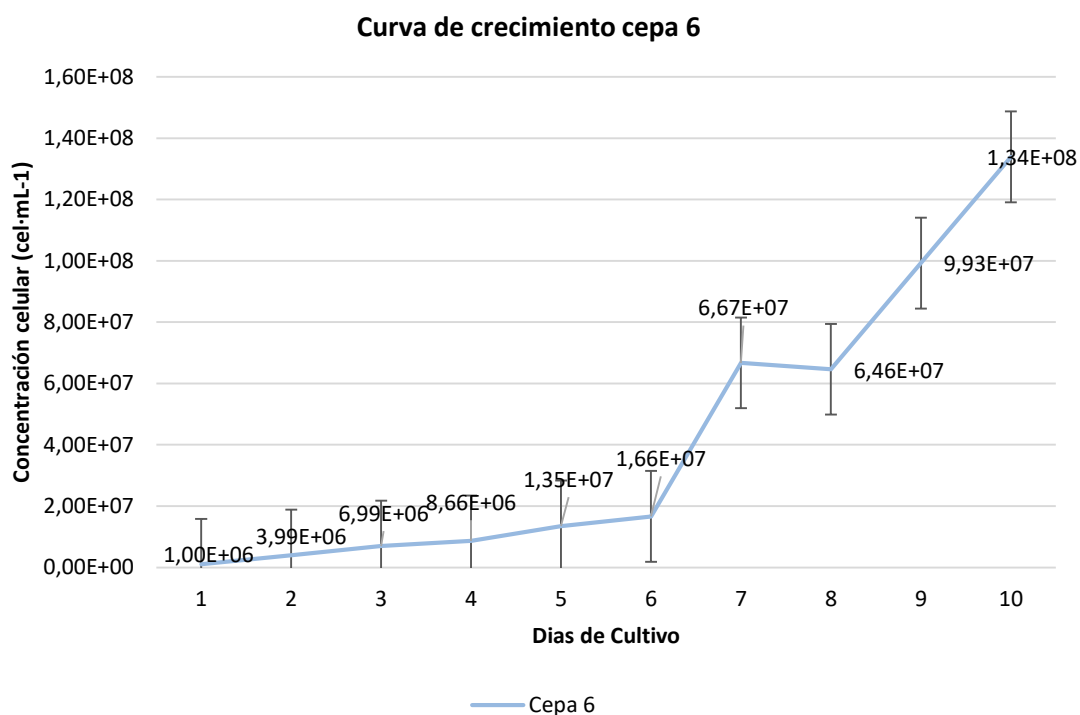
Las investigaciones que se han realizado con microalgas nativas del Ecuador son pocas, sin embargo, presentan valores más cercanos a los obtenidos en esta investigación. Para *Chorella* sp. se reporta que esta posee un 7,31%, 21% y 9% de lípidos en peso seco según Hinojosa, 2015; Quintanilla, 2016; G. Ruiz, 2015 respectivamente.

## 5.5 Evaluación del crecimiento de cepas de microalgas

### 5.5.1 Determinación de curva de crecimiento

Se seleccionó la cepa 6 en base a dos criterios: producción de biomasa y porcentaje de grasas. Por lo tanto, se determinó la curva de crecimiento mediante el conteo celular en la cámara de Neubauer.

La concentración inicial del cultivo de la cepa 6 fue de  $1 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup>. La fase de latencia se dio durante los primeros 18 días desde de la inoculación del cultivo en donde presentó una concentración celular de  $1,66 \times 10^7$  cel·mL<sup>-1</sup>. La fase exponencial comenzó desde el día 18 hasta el día 30, en donde la concentración final de la cepa 6 fue de  $1.34 \times 10^8$  cel·mL<sup>-1</sup>. En la figura 11 se muestra la curva obtenida.



*Figura 11.* Curva de crecimiento de la cepa 6.

a) Se muestra la tendencia de crecimiento de las células y las barras de error obtenidas.

La producción de biomasa obtenida de la cepa 6 al final del tiempo de cultivo en fotobiorreactores tubulares de 40L después de haber realizado la floculación, el filtrado y el secado fue de  $1,25 \text{ g.L}^{-1}$  con una concentración de  $2,37 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ , dicha biomasa obtuvo un porcentaje de 3,75 % de contenido lipídico en peso seco. Estos parámetros fueron superiores al resto de especies de microalgas utilizadas y por esta razón se seleccionó a la cepa 6 para producción de biodiesel y se decidió elaborar una curva de crecimiento para determinar el tiempo en el cual llega a la fase exponencial.

La fase de latencia se observó durante los primeros 15 días de cultivo. Reportes indican que con medios de cultivo evaluados para un óptimo crecimiento de *Scenedesmus* sp. la fase de latencia se da durante los primeros 4 días, con un inóculo de  $2 \text{ gl}^{-1}$  (Quevedo , Morales , & Acosta 2008), mientras que Meneses (2015) reporta que *Chlorococum* sp. se demora más 12 días en llegar a la fase exponencial con una concentración inicial de  $1 \times 10^6 \text{ cel.ml}^{-1}$ . La fase de latencia de la cepa 6 se encuentra fuera del rango de los encontrados en bibliografía. Sin embargo, alcanza una concentración final normal después de 30 días de cultivo.

La concentración de biomasa microalgal aumentó rápidamente en la fase exponencial, la cual ocurrió desde el día 15, sin embargo, entre la medición del día 21 y el día 24 la concentración microalgal disminuyó. El dato presente en la muestra del día 24 fue despreciado para calcular la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación debido a posibles errores en el muestreo y a la desviación estándar calculada.

### **5.5.2 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación celular**

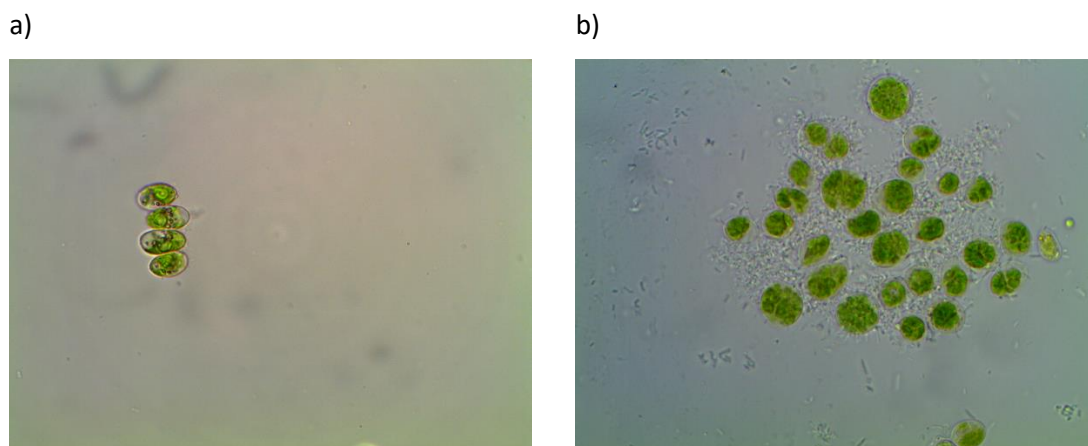
Con los datos obtenidos en el conteo celular y la curva de crecimiento se procedió a determinar la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación de la cepa 6. La velocidad de crecimiento fue de  $0.29 \text{ día}^{-1}$ , con un tiempo de duplicación de 3.69 días en la fase exponencial.

En reportes como en el de Quevedo et al (2008) se indica que la velocidad de crecimiento para *Scenedesmus* sp. fluctúa entre valores de 0,035 y 0,059 horas<sup>-1</sup> esto es equivalente a valores entre 0,72 y 1,41 días<sup>-1</sup>, y tiempos de duplicación entre 0,49 y 0,82 días. En comparación se podría inferir que los resultados obtenidos en esta investigación la velocidad de crecimiento es menor a la obtenida por Quevedo et al (2008) y que el tiempo de duplicación se encuentra sobre el rango superior. Sin embargo, en un reporte más actual de Difusa, Talukdar, Kalita, Mohanty, and Goud (2015) se indica que para varias especies de *Scenedesmus* el valor de la velocidad de crecimiento se encuentra entre 0,17 y 0,33 días<sup>-1</sup> mientras que los valores del tiempo de duplicación fluctúan entre 2,07 y 4,06 días.

Además, en investigaciones realizadas en el BIOTEC se encontraron resultados similares a los obtenidos en este trabajo de titulación. Meneses (2015) reporta que para un consorcio de *Scenedesmus* sp. y *Chorococcum* sp. la velocidad de crecimiento está entre 0,3 y 0,38 generaciones.día<sup>-1</sup> y que el tiempo de duplicación está entre 1,84 y 2,30, mientras que Cabrera (2016) reporta que para *Scenedesmus* sp. la velocidad de crecimiento es de 0,308 cel.día<sup>-1</sup> y el tiempo de duplicación es de 2,24 días. Por lo tanto los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran cerca de los rangos establecidos en los trabajos previamente citados.

## **5.6 Lisis celular**

Las células respondieron favorablemente a los efectos correspondientes del tratamiento para lisis celular. Como consecuencia del choque osmótico, las células se hincharon; y después del tratamiento con microondas se deformaron. En la figura 12a se puede apreciar a las células previo a los tratamientos, y a las células después de la inducción de la lisis celular en la figura 12b.



**Figura 12.** Lisis celular de la cepa 6

- a) las células de microalgas previas a la lisis celular
- b) células deformadas debido al choque osmótico y microondas

Se realizó ensayos preliminares para realizar la lisis celular (autoclave, microondas y choque osmótico), sin embargo, en ninguno de los tratamientos se obtuvo resultados favorables debido a que la célula no presentó cambios morfológicos considerables. En reportes como el de Lee et al. (2010) se indica que el uso de metodologías como el autoclave, microondas y choque osmótico, entre otras; generan un lisado celular exitoso, aunque esto no se evidenció en la investigación realizada.

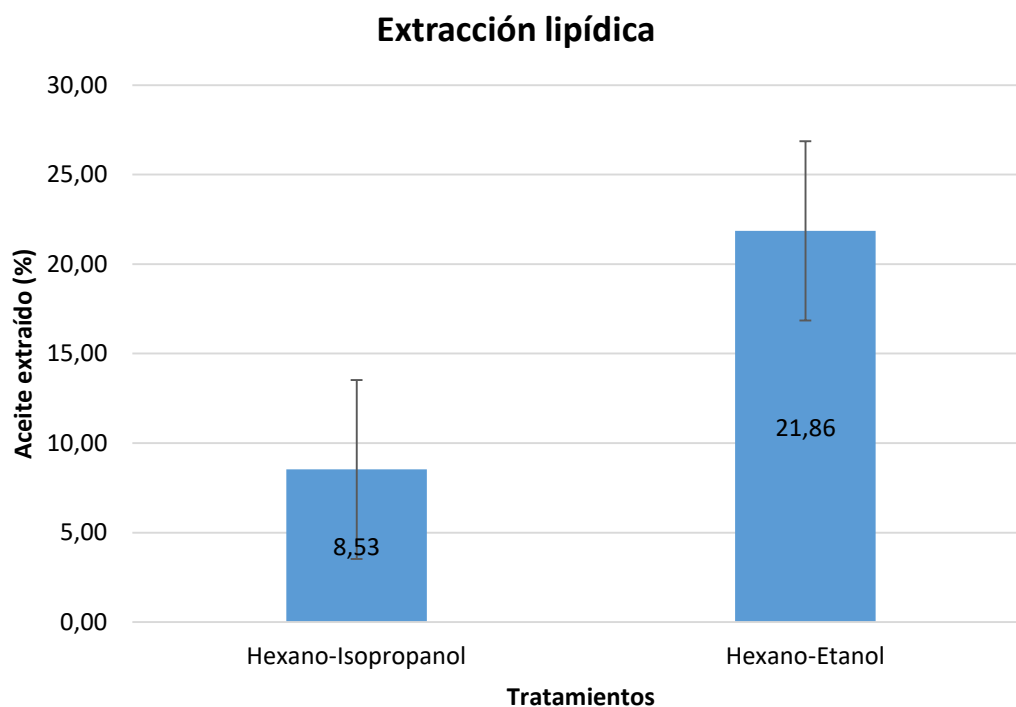
Posteriormente, se decidió evaluar tres ensayos de dos metodologías en conjunto: la primera fue choque osmótico y autoclave, la segunda fue choque osmótico y microondas y la tercera fue microondas y autoclave. Se evidenció que en la combinación de choque osmótico y microondas las células fueron deformadas y que hubo una ruptura celular (Figura 11) Por lo tanto, se decidió realizar las dos metodologías en conjunto.

Se obtuvieron valores porcentuales de contenido lipídico de entre 1,93% y 3,75% para las especies *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp. utilizando dos métodos de lisado celular en conjunto. Sin embargo, en el reporte de Lee et al. (2010), se menciona que el porcentaje de lípidos en relación de peso seco utilizando choque osmótico es cercano al 10% para *Botryococcus* sp., *Scenedesmus* sp. y

*Chlorella vulgaris*, mientras que con el uso de microondas se obtuvo valores superiores al 25% en el caso de *Botryococcus* sp. y valores superiores al 10% para *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*. Existen otros reportes en donde se menciona que utilizando la metodología de lisado celular por microondas se obtuvo un 32,8% de contenido lipídico en *Nanochloropsis* sp. (Koberg, Cohen, Ben-Amotz, & Gedanken, 2011), 58,7% de contenido lipídico en *Nanochloropsis salina* (Schwede, Kowalczyk, Gerber, & Span, 2011) y 33,7% de contenido lipídico para consorcios (Florentino de Souza Silva et al., 2014). Además, para la metodología de choque osmótico con NaCl existen reportes de *Chlamydomonas reinhardtii* en donde se menciona que se obtuvo valores porcentuales de contenido lipídico de mayores a 30% (Yoo, Park, Kim, Choi, & Yang, 2012). Por lo tanto, los valores obtenidos en esta investigación están por debajo de lo que se obtuvo en los reportes citados previamente.

### **5.7 Extracción de lípidos**

El solvente ocupado para el primer tratamiento fue hexano-isopropanol y se obtuvo un promedio de 8,53% de aceite en peso seco. Por otro lado, el tratamiento 2 se realizó con una mezcla de hexano-etanol y se obtuvo un promedio de 21,86% de aceite microalgal en peso seco. El aceite derivado de microalgas de la cepa 6 obtuvo una densidad estimada de 1,066 g·mL<sup>-1</sup>. (Figura 13)



*Figura 13.* Extracción lipídica de microalgas de la cepa 6.

a) Porcentajes promedios obtenidos de la extracción y las barras de error respectivas.

Se obtuvieron valores promedio de 21,86% de lípidos totales en peso seco usando como disolvente una mezcla de hexano-etanol, mientras que el uso de hexano-isopropanol permitió generar un valor promedio de 8,53%. Los porcentajes obtenidos son superiores a los registrados en el reporte de Ramluckan (2014), en donde se describe que *Chorella* sp. obtiene 10% de contenido lipídico con el uso de hexano, 6% mediante el uso de Isopropanol y de ~11% con el uso de etanol. Existen otros reportes en donde se menciona que el uso de hexano-isopropanol en *Botryococcus braunii* extrae un valor aproximado del 20% de contenido lipídico, mientras que el uso de la mezcla cloroformo-metanol un valor superior a 18% (Dos Santos, Moreira, Kunigami, Aranda, & Teixeira, 2015). Por otro lado, el uso de hexano-isopropanol en la microalga *Nanochloropsis* sp. generó un valor entre 25,5-31,9% de contenido lipídico (Long & Abdelkader, 2011); en las especies *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella protothecoides*, el uso de hexano-etanol y de hexano puro generaron valores de 6% y de 2-3% de contenido lipídico respectivamente (Li et al., 2014), por lo que

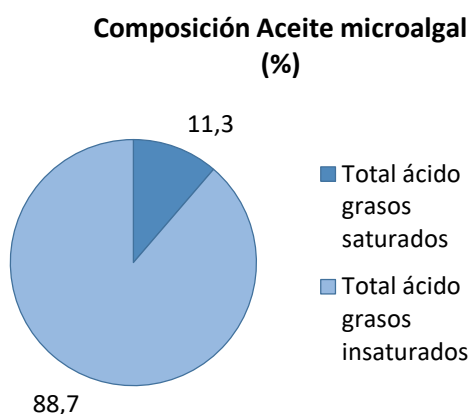


se puede inferir que la cantidad de lípidos obtenida es influenciada por el disolvente utilizado y por la especie microalgal a la que se le aplica el tratamiento.

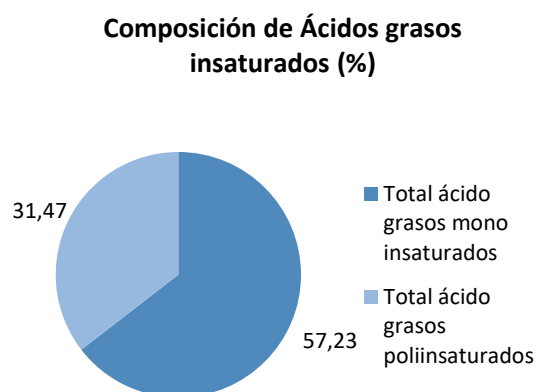
### 5.8 Análisis de perfil lipídico

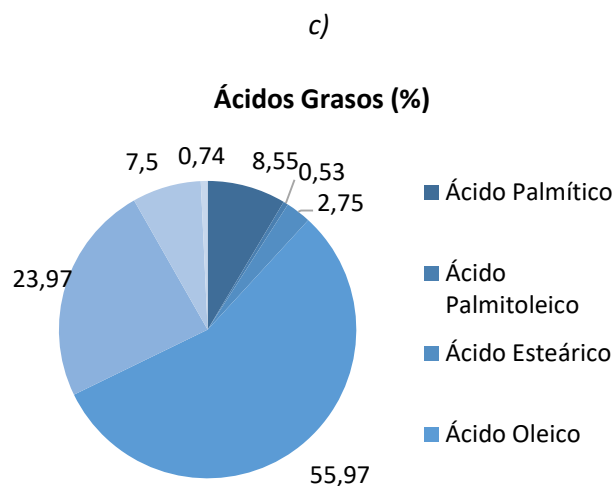
Se realizó un análisis de perfil lipídico del aceite obtenido y se obtuvo la composición del aceite microalgal (Figura 14a), composición de ácidos grasos insaturados (Figura 14b) y todos los ácidos grasos (saturados e insaturados) presentes en la muestra (Figura 14c). El aceite obtenido contiene un 55,97% de ácido oleico, 8,55% de ácido palmítico y 2,75% de ácido esteárico, los cuales son importantes para la producción de biodiesel (Anexo 7).

a)



b)





**Figura 14.** Análisis de perfil lipídico del aceite microalgal.

- a) Composición de aceite microalgal
- b) Composición de grasos insaturados
- c) Ácidos grasos.

Para la producción biodiesel de calidad, se conoce que es necesario obtener una muestra lipídica que contenga ácidos grasos con bajo grado de insaturación y que sean de cadena larga, entre los más importantes se mencionan el ácido palmítico (16 C), oleico (18 C) y mirístico (14 C) (Arias Peñaranda, Martínez, & Cañizares, 2013) y el análisis de la muestra de aceite microalgal obtenido indica que, este contiene un 55,97% de ácido oleico, es decir, más de la mitad de ácidos grasos de la muestra; por lo que se podría inferir que el perfil lipídico del aceite microalgal obtenido es apto para la elaboración de biodiesel.

Además, existen reportes de varias especies de microalgas con ácidos grasos necesarios para la producción de éster metílico (biodiesel). Por ejemplo, Harwati, Willke, and Vorlop (2012) indican que, *Chlorococcum humicola* contiene ácido palmítico (35-42%), esteárico (1,2-2,53%) oleico (15,95-23,3%), linoleico (13,83-14,43%) y linolenico (14,64-23,84%); mientras que microalgas como *Scenedesmus rubescens* y *Scenedesmus incrassatulus* tienen un 54% y 78,8% de ácido oleico respectivamente (Arias Peñaranda et al., 2013), con estos datos se puede determinar que los valores de porcentaje de ácidos grasos obtenidos en esta investigación se ajustan a los reportados.

Por otro lado, el análisis lipídico del aceite microalgal obtenido de la cepa 6 indica que esta presenta un 55,97% ácido oleico, mientras que varios reportes indican que *Scenedesmus* sp. contiene valores porcentuales de ácido oleico entre: 21,5 y 24,9 % (Tripathi, Singh, & Thakur, 2015); 6,45 y 8,47% (Shin, Ryu, Bae, Crofcheck, & Crocker, 2014); 12 y 18% (Ho, Chen, & Chang, 2012). Por lo tanto, la cepa 6 presenta mayor cantidad de ácido oleico que los reportados en otras investigaciones, sin embargo la cantidad obtenida de grasas totales para la cepa 6 es baja.

### 5.9 Análisis Estadístico

El análisis estadístico evaluó si existe una diferencia significativa en el uso de dos mezclas de solventes para la extracción lipídica. El tratamiento 1 fue la extracción realizada con hexano-isopropanol, mientras que el tratamiento 2 refleja el uso de hexano-etanol.

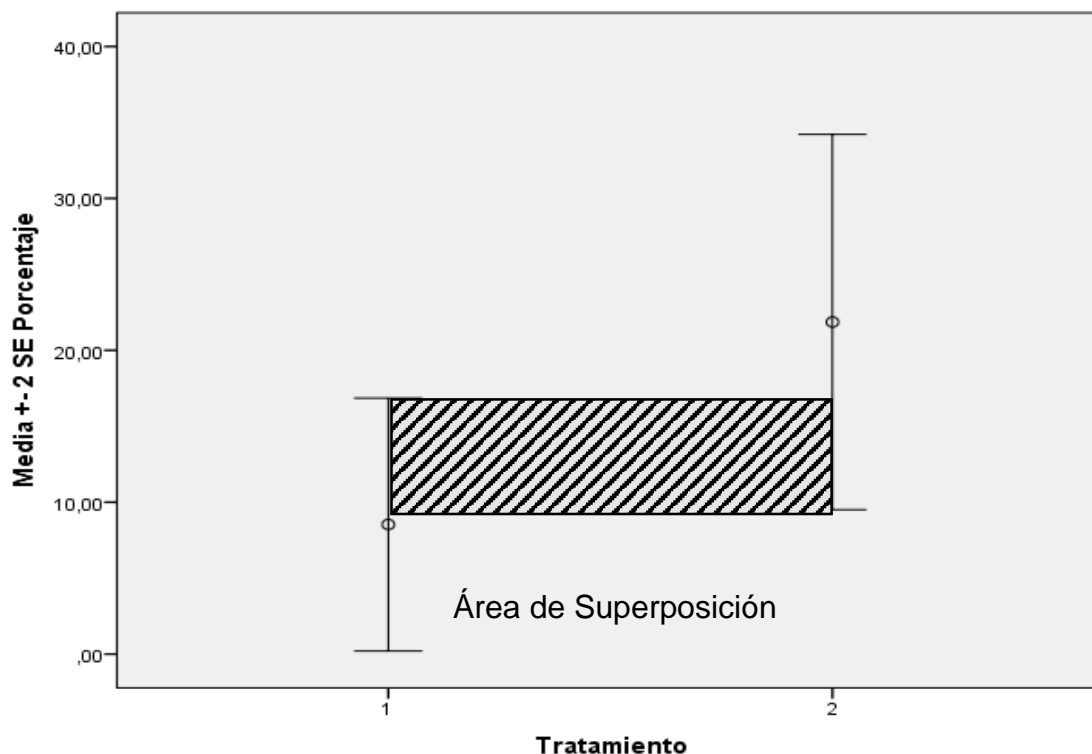
El análisis se realizó con una prueba T de student con en el programa SPSS Statistics 24 con el que se obtuvo los siguientes valores (tabla 11):

Tabla 10.

*Análisis estadístico.*

	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>
<b>Tratamiento 1</b>	8,53	7,21
<b>Tratamiento 2</b>	21,86	10,7

También indica que se trabajó con un error de 0,05; con 3,5 grados de libertad (GL) y se obtuvo un valor de prueba (P) de 0,158. Además, en la figura 15 se puede observar las barras del análisis y la superposición de las mismas.



*Figura 15.* Análisis estadístico

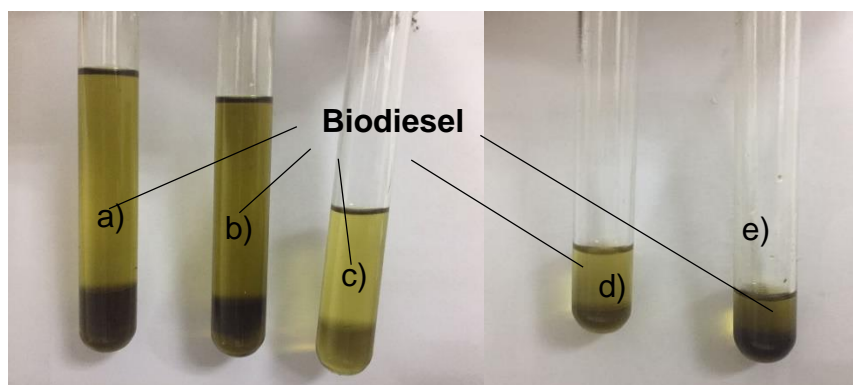
a) Análisis estadístico con prueba T de student, siendo el tratamiento 1 el ensayo de extracción lipídica con Hexano-Isopropanol y el tratamiento 2 con Hexano-Etanol. Se indica la superposición de las barras.

Los datos obtenidos en el análisis para la prueba T de student determinaron que no existen diferencias estadísticas significativas entre el uso de los disolventes hexano-isopropanol y hexano-etanol para la obtención de lípidos, esto se puede evidenciar con la superposición de las barras en la figura 6 y debido a que el valor de P fue de 0,158 se aceptó la hipótesis nula del planteamiento.

### 5.10 Transesterificación

Los seis envases a volúmenes diferentes que se obtuvieron de la extracción lipídica fueron transesterificados por separado. El envase con menor volumen de lípidos no registró la separación de fases típica de una transesterificación. Sin embargo, en los cinco tubos restantes se pudo observar la separación de biodiesel o éster metílico (sobrenadante) y glicerina después de la reacción

(precipitado) (Figura16). En total se transesterificó 17,1 ml de aceite microalgal, el cual tuvo como resultado 11,2 ml de biodiesel con un pH de 9,8.



*Figura 16.* Transesterificación

- a) Biodiesel obtenido del aceite extraído con Hexano-Etanol, 5,5 ml.
- b) Biodiesel obtenido del aceite extraído con Hexano-Etanol, 5 ml.
- c) Biodiesel obtenido del aceite extraído con Hexano-Isopropanol, 3 ml.
- d) Biodiesel obtenido del aceite extraído con Hexano-Etanol, 1,8 ml.
- e) Biodiesel obtenido del aceite extraído con Hexano-Isopropanol, 1,5 ml.
- f) Separación de fases de la transesterificación en donde el sobrenadante es el metil éter y el precipitado es glicerina.

Los cinco ensayos realizados de transesterificación, el aceite microalgal generó una productividad del 65%. Pese a que la cantidad de lípidos presentes en la cepa 6 es baja en relación a otras especies de microalgas mencionadas anteriormente se logró una productividad mayor al 50%.

Suponiendo que con los datos obtenidos en esta investigación se realizara una producción industrial de biodiesel, se tendría una productividad de 622,74  $L_{\text{biodiesel}} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$  de la cepa 6 con un contenido lipídico de 3,75%, mientras que el reporte de Schenk et al. (2008), indican que obtuvo una productividad de 12 000 y 98 500  $L \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$  con especies de microalgas que contienen un 30% de TAG 50% de TAG respectivamente.

Por otro lado, Mata et al. (2010) reporta que la productividad de microalgas para la generación de biodiesel es mucho más alta que varias especies vegetales, sin importar si la microalga posee un contenido lipídico bajo, mediano o alto. Por

ejemplo, el maíz (*Zea mays* L.) tiene una productividad de 152 ( $\text{kg}_{\text{biodiesel}} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ ), la soya (*Glycine max* L.) produce 562 ( $\text{kg}_{\text{biodiesel}} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ ) y el aceite de palma (*Elaeis guineensis*) genera 4747 ( $\text{kg}_{\text{biodiesel}} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ ), mientras que las microalgas presentan valores de productividad que oscilan entre 51,927 – 121, 104 ( $\text{kg}_{\text{biodiesel}} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ ). Sin embargo, si se realizara una producción industrial con los datos obtenido en esta investigación se obtuviera una productividad de 539,29  $\text{kg}_{\text{biodiesel}} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ , el cual es un valor por debajo de los reportados.

## **6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **6.1 Conclusiones**

La producción de lípidos fue escasa en comparación con cepas utilizadas en la elaboración de biodiesel a nivel industrial, por lo que se presume que ninguna de las microalgas utilizadas en esta investigación es viable para la producción de biodiesel a gran escala debido al bajo porcentaje de grasas totales que presentaron.

Las microalgas en este estudio mostraron una alta concentración de ácido oleico presente en el aceite microalgal obtenido.

La reactivación de microalgas conservadas fue efectiva para el 71% del total de cepas seleccionadas. El 80% de microalgas reactivadas en este estudio se adaptan a medios NPK (agua potable y Nitrofoska) considerado más sencillo y económico que los comerciales sin que su crecimiento se vea afectado.

La cepa 6, CMIE-B2-009 perteneciente a la Reserva Ecológica Antisana de la laguna La Mica, presentó la recuperación de biomasa en peso seco más alta, el mayor porcentaje de grasas totales y la mejor concentración celular a los 20 días de cultivo en fotobiorreactores tubulares. Sin embargo, el porcentaje de lípidos extraídos para la producción de biodiesel es bajo.

Las cantidades obtenidas de biodiesel fueron bajas para realizar un análisis completo de las características físico-químicas.

No hubo una diferencia significativa en la evaluación de solventes para la extracción de lípidos con el uso de Soxhlet.

### **6.2 Recomendaciones**

Se sugiere hacer estudios moleculares de las cepas del CMIE para poder identificar la taxonomía completa de las microalgas previo a la selección de estas para diferentes estudios.

Hacer un diseño experimental para determinar que haya una significancia en la selección de cepas según el porcentaje de grasas totales que poseen para la elaboración de biodiesel.

Evaluar métodos de lisis celular previa a la elaboración de biodiesel a escala piloto debido a que el aceite se encuentra en el interior de la célula y si la composición de la pared celular no ha sido estudiada la ruptura celular no se alcanza con facilidad.

Analizar más solventes orgánicos para la extracción de lípidos microalgales debido a que las cantidades de aceite extraídos depende directamente de los solventes utilizados y de la pared celular de las microalgas.

Analizar la cepa 6 correspondiente a CMIE-B2-001 para aplicaciones en la industria alimenticia debido a que el análisis de perfil lipídico realizado al aceite obtenido de esta cepa indicó que hay presencia de omega 3 y 6 en un 31,47%.



## REFERENCIAS

- Alam, F., Date, A., Rasjidin, R., Mobin, S., Moria, H., & Baqui, A. (2012). *Biofuel from Algae- Is It a Viable Alternative?* Procedia Engineering, 49, 221-227. doi: 10.1016/j.proeng.2012.10.131
- Andrade, C. E., Vera, A. L., Cárdenas, C. H., & Morales, E. D. (2009). Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería. *Revista Técnica*, 32(2), 126-135. Recuperado el 4 de junio del 2017 de <http://go.galegroup.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA465112730&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=fulltext&issn=02540770&p=AONE&sw=w&authCount=1&isAnonymousEntry=true>
- Antunes, R., & Silva, I. (2010). Utilización de algas para la producción de biocombustibles. Instituto Nacional de Propiedad Industrial.
- Aransiola, E. F., Ojumu, T. V., Oyekola, O. O., Madzimbamuto, T. F., & Ikhu-Omoregbe, D. I. O. (2014). *A review of current technology for biodiesel production: State of the art*. *Biomass and Bioenergy*, 61, 276-297. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.11.014
- Arias Peñaranda, M. T., Martínez, A. D. J., & Cañizares, R. O. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 43-68. Recuperado en línea el 14 de mayo del 2014 de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v18n1/v18n1a4.pdf>
- Atabani, A. E., Silitonga, A. S., Badruddin, I. A., Mahlia, T. M. I., Masjuki, H. H., & Mekhilef, S. (2012). *A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2070-2093. doi: 10.1016/j.rser.2012.01.003
- Banco Mundial (2017), Consumo de energía procedente de combustibles fósiles (% del total). Recuperado el 11 de Mayo del 2017 de <http://datos.bancomundial.org/indicador/EG.USE.COMM.FO.ZS>
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. M. (2015). *Harvesting techniques applied to microalgae: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489-1500. doi: 10.1016/j.rser.2014.09.037
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology: CRC press*. Recuperado el 24 de abril del 2017 de <https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=AZCIAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Algae:+anatomy,+biochemistry,+and+biotechnology:+CRC+press&ots=aF84Tn-ZAi&sig=80a9AUfiMs6RAMnrdW-ds51-GX0#v=onepage&q=Algae%3A%20anatomy%2C%20biochemistry%2C%20and%20biotechnology%3A%20CRC%20press&f=false>
- Bastidas, O. (2008). <Conteo-Camara-Neubauer.pdf>. Recuperado el 6 de abril del 2017 de <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>

- Bermúdez, J. L., Lodeiros, C., & Morales, E. (2002). Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad. Recuperado el 2 de junio del 2017 de <http://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/3182/ARTICULO09.pdf?sequence=1>
- Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). *Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species*: University of Texas.
- Burgos, I. (2017), Combustibles fósiles vs energías renovables. Recuperado el 11 de Mayo del 2017 de <http://www.energiasrenovablesinfo.com/general/combustibles-fosiles-vs-energias-renovables/>
- Cabrera, C. (2016). Evaluación compartiva de dos tipos de flocculantes para la cosecha de biomasa de microalgas a escala piloto. Repositorio UDLA. Recuperado el 27 de Marzo del 2017 de "<http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5883>"
- Cargua, D. (2015). Evaluación de la disminución de nitrógeno para el cultivo de *Chlorella* SP. Nativa y su efecto sobre el contenido lipídico, en el laboratorio de biotecnología energética Empresa Eléctrica Quito-Ecuador. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armada ESPE. Matriz Sangolquí. Recuperado el 3 de junio del 2017 de <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/10937>
- CCALA (2017). Culture Collection of Autotrophic Organisms, Institute of Botany CAS, Dukelská 135, TŘEBOŇ. Recuperado el 16 de Mayo del 2017 de "<http://ccala.butbn.cas.cz/en>"
- Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). *Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review*. *Bioresour Technol*, 102(1), 71-81. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.159
- Chisti, Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*. *Biotechnol Adv*, 25(3), 294-306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Demirbas, A., & Demirbas, M. F. (2011). *Importance of algae oil as a source of biodiesel*. *Energy conversion and management*, 52(1), 163-170. Recuperado el 15 de marzo del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.055>
- Difusa, A., Talukdar, J., Kalita, M. C., Mohanty, K., & Goud, V. V. (2015). *Effect of light intensity and pH condition on the growth, biomass and lipid content of microalgae Scenedesmus species*. *Biofuels*, 6(1-2), 37-44. doi: 10.1080/17597269.2015.1045274
- Dos Santos, R. R., Moreira, D. M., Kunigami, C. N., Aranda, D. A., & Teixeira, C. M. (2015). *Comparison between several methods of total lipid extraction from Chlorella vulgaris biomass*. *Ultrason Sonochem*, 22, 95-99. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.05.015
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2010). *Third generation biofuels from microalgae. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 2, 1355-1366. Recuperado el 20 de abril del 2017 de <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/16807>

- Dufey, A., (2016). Producción y Comercio de biocombustibles y desarrollo sustentable: los grandes temas. Programa de Economía Ambiental. Recuperado el 6 de abril del 2017 de "[https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=8q85\\_nrOh2gC&oi=fnd&pg=PA1&dq=+biocombustibles&ots=f\\_\\_eCBtt48&sig=A94nzzvKCSUrunBTRx4M2eij1lk#v=onepage&q=biocombustibles&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=8q85_nrOh2gC&oi=fnd&pg=PA1&dq=+biocombustibles&ots=f__eCBtt48&sig=A94nzzvKCSUrunBTRx4M2eij1lk#v=onepage&q=biocombustibles&f=false)"
- Fernández, J. (2014). Ingeniería de procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. Recuperado el 02 de abril del 2017 de <http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/index.html>
- Fernandez, J., (2004). Energía de la Biomasa. Recuperado el 6 de abril del 2017 de "<http://www.fenercom.com/pdf/publicaciones/cuadernos-energias-renovables-para-todos-biomasa.pdf>"
- Ferrell, J., & Sarisky-Reed, V. (2010). *National algal biofuels technology roadmap*: EERE Publication and Product Library. doi: 10.2172/1218560
- Fishman, D., Majumdar, R., Morello, J., Pate, R., & Yang, J. (2010). *National algal biofuels technology roadmap*. US Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program, US Department of Energy, 140.
- Florentino de Souza Silva, A. P., Costa, M. C., Colzi Lopes, A., Fares Abdala Neto, E., Carrhá Leitão, R., Mota, C. R., & Bezerra dos Santos, A. (2014). *Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae*. *Renewable Energy*, 63, 762-766. doi: 10.1016/j.renene.2013.10.038
- Flores, R. E. O., Hernández, J. G. S., & Hernández, C. E. M. (2015). Desarrollo de un proceso de bajo costo para la producción de biobutanol. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 1(2), 1322-1326. Recuperado el 20 de Marzo del 2017 de "<http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/134/pdf1>"
- Garibay-Hernández, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez Saavedra, M. d., Serrano Carreón, L., & Martínez Jiménez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*, 13(3), 38-61.
- Gerde, J. A., Yao, L., Lio, J., Wen, Z., & Wang, T. (2014). *Microalgae flocculation: Impact of flocculant type, algae species and cell concentration*. *Algal Research*, 3, 30-35. doi: 10.1016/j.algal.2013.11.015
- Gonzalez, M. G. N. (2016). Catálogo de Microalgas y Cianobacterias de Agua Dulce del Ecuador. Corporación para la investigación Energética, Laboratorio de Biotecnología Energética, Quito, Ecuador.,
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). *Microalgae as a raw material for biofuels production*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36(2), 269-274. doi: 10.1007/s10295-008-0495-6
- Guillard, R. (1973). *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Inglaterra: Cambridge University Press. Recuperado el 14 de mayo del 2017 de [https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=k-08AAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PR13&dq=Handbook+of+Phycological+Methods:+Culture+Methods+and+Growth+Measurements.&ots=V\\_2WR](https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=k-08AAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PR13&dq=Handbook+of+Phycological+Methods:+Culture+Methods+and+Growth+Measurements.&ots=V_2WR)

- EcNCU&sig=PTH5Rk3zAIJKkTyYFaGNi3s3IXQ#v=onepage&q=Handbook%20of%20Phycological%20Methods%3A%20Culture%20Methods%20and%20Growth%20Measurements.&f=false
- Gunerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). *Cell disruption for microalgae biorefineries*. *Biotechnol Adv*, 33(2), 243-260. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.008
- Guo, F., Zhao, J., A, L., & Yang, X. (2016). *Life cycle assessment of microalgae-based aviation fuel: Influence of lipid content with specific productivity and nitrogen nutrient effects*. *Bioresour Technol*, 221, 350-357. doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.044
- Halim, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). *Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review*. *Biotechnol Adv*, 30(3), 709-732. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.001
- Halim, R., Harun, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). *Microalgal cell disruption for biofuel development*. *Applied Energy*, 91(1), 116-121. doi: 10.1016/j.apenergy.2011.08.048
- Harwati, T. U., Willke, T., & Vorlop, K. D. (2012). *Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae Chlorococcum sp.* *Bioresour Technol*, 121, 54-60. doi: 10.1016/j.biortech.2012.06.098
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). *Microalgas, cultivo y beneficios*. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173. doi: 10.4067/s0718-19572014000200001
- Hinojosa, V. (2015). *Producción de biodiesel a partir de microalgas nativas cultivadas en un fotobiorreactor a escala laboratorio*. Universidad San Francisco de Quito, 40. Recuperado el 27 de Marzo del 2017 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/4798>
- Ho, S. H., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2012). *Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N*. *Bioresour Technol*, 113, 244-252. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.133
- Hoekman, S. K., & Robbins, C. (2012). *Review of the effects of biodiesel on NO<sub>x</sub> emissions*. *Fuel Processing Technology*, 96, 237-249. doi: 10.1016/j.fuproc.2011.12.036
- Hossain, A. B. M. S., Salleh, A., Boyce, A. N., Chowdhury, P., & Naqiuddin, M. (2008). *Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(3), 250-254. doi: 10.3844/ajbbbsp.2008.250.254
- Jimenez, I., (2008). *Transferencia tecnológica sobre las ventajas y desventajas de la utilización de biodiesel*. Recuperado el 4 de Abril del 2017 "http://www.ina.ac.cr/mecanica\_de\_vehiculos/Transferencia%20tecnologica%20sobre%20ventajas%20y%20desventajas%20de%20la%20Utilizacion%20del%20biodiesel.pdf"
- Knothe, G., Krahl, J., & Van Gerpen, J. (2015). *The Biodiesel Handbook*: Elsevier Science. Recuperado de 15 de abril del 2017 de <https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=8MxcCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=the+Biodiesel+Handbook&ots=8cWMoft9VO&sig=wJi4bU->

- iDITc4PDnEQEGGWVX1Uo#v=onepage&q=the%20Biodiesel%20Handbook&f=false
- Koberg, M., Cohen, M., Ben-Amotz, A., & Gedanken, A. (2011). *Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of Nannochloropsis by microwave and ultrasound radiation*. *Bioresour Technol*, 102(5), 4265-4269. doi: 10.1016/j.biortech.2010.12.004
- Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. (2010). *Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae*. *Bioresour Technol*, 101 Suppl 1, S75-77. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.058
- Li, Y., Naghdi, F. G., Garg, S., Adarme-Vega, T. C., Thurecht, K. J., Ghafor, W. A., . . . Schenk, P. M. (2014). *A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research*. *Microbial cell factories*, 13(1), 14. Recuperado el 21 de mayo del 2017 de <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-14>
- Lobba, C., Chapman D., & Klemer, B. (1998). *Experimental Phycology: A laboratory Manual*. New York, EEUU: Cambrigde University Recuperado el 13 de mayo del 2017 de <https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=a2o5AAAIAAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=Experimental+Phycology:+A+laboratory+Manual&ots=cKSTeDJR9y&sig=0pDkMWX48ngtn30KX2MdotCRyyE#v=onepage&q=Experimental%20Phycology%3A%20A%20laboratory%20Manual&f=false>
- Long, R. D., & Abdelkader, E. (2011). *Mixed-polarity azeotropic solvents for efficient extraction of lipids from Nannochloropsis microalgae*. *Am J Biochem Biotechnol*, 7(2), 70-73. Recuerado el 20 de mayo del 2017 de <https://core.ac.uk/download/pdf/25728540.pdf>
- Malgas. (2013). *Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica*. Recuperado el 17 de abril del 2017 de "http://proyectomalgas.com/wp-content/uploads/2014/05/GuiaMicroalgas.pdf"
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232. doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020
- Meneses, M. (2015). *Evaluación de la capacidad de remoción de contaminantes, productividad de biomasa y contenido lipídico, alcanzados mediante el cultivo de un consorcio microalgal utilizando agua con nutrientes del reservorio de Guangopolo de la empresa Eléctrica Quito*. Ingeniería en Biotecnología, ESPE, Quito. Recuperado el 27 de Marzo del 2017 de " <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/11257>"
- Metting, F. (1996). *Biodiversity and application of microalgae*. *Journal of industrial microbiology*, 17(5-6), 477-489. Recuperado el 18 de abril del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01574779>
- Monari, C., Righi, S., & Olsen, S. I. (2016). *Greenhouse gas emissions and energy balance of biodiesel production from microalgae cultivated in photobioreactors in Denmark: a life-cycle modeling*. *Journal of Cleaner Production*, 112, 4084-4092. Recuperado el 3 de Abril del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.08.112>

- Moreno, N., Kafarov, V., & Plata, V. (2009). Desarrollo de una metodología de transesterificación de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. Recuperado el 16 de mayo del 2017 de <http://hdl.handle.net/11619/1346>
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., & Bux, F. (2011). *Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production*. *Bioresour Technol*, 102(1), 57-70. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.077
- Paez, S. (2016). Evaluación Comparativa del Crecimiento de la Microalga CMIE-H2-001 en Fotobiorreactores Discontinuos de Tipo Tubular y Panel. Tesis. Recuperado el 27 de Marzo del 2017 de "<http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5206>"
- Petrou, E. C., & Pappis, C. P. (2009). Biofuels: a survey on pros and cons. *Energy & Fuels*, 23(2), 1055-1066. doi: 10.1021/ef800806g
- Pohndorf, R. S., Camara, Á. S., Larrosa, A. P., Pinheiro, C. P., Strieder, M. M., & Pinto, L. A. (2016). *Production of lipids from microalgae Spirulina sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods*. *Biomass and Bioenergy*, 93, 25-32. Recuperado el 14 de mayo del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.020>
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). *Commercial and industrial applications of micro algae—A review*. *J algal biomass utln*, 3(4), 89-100. Recuperado el 15 de abril del 2017 de [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44276968/paper14vol3no4.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1502178402&Signature=GOc8J%2BKHethSHfQdBE%2B5jsvejYU%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DCommercial\\_and\\_industrial\\_applications\\_o.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44276968/paper14vol3no4.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1502178402&Signature=GOc8J%2BKHethSHfQdBE%2B5jsvejYU%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DCommercial_and_industrial_applications_o.pdf)
- Quemada, J., Gonzalez, E., (2013). El futuro de los combustibles fósiles. Grupo de Investigación Economía Política Internacional. Recuperado el 11 de Mayo del 2017 de "<https://canal.uned.es/uploads/materials/resources/pdf/4/1/1319025174814.pdf>"
- Quevedo, C., Morales, S. P., & Acosta, A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae*, 15, 25-31. Recuperado 1 de junio del 2017 de <http://www.redalyc.org/html/1698/169815394004/>
- Quintanilla, F. (2016). *Production and characterization of biodiesel from microalgae cultivated in a photobioreactor at laboratory scale*. Universidad San Francisco de Quito, 42. Recuperado el 17 de Marzo del 2017 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/5700>
- Ramluckan, K., Moodley, K. G., & Bux, F. (2014). *An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method*. *Fuel*, 116, 103-108. doi: 10.1016/j.fuel.2013.07.118
- Randall, E.L. (1974) *Improved method for fat and oil analysis by a new process of extraction*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57, 1165-1168.

- Rashid, N., Rehman, M. S. U., Sadiq, M., Mahmood, T., & Han, J.-I. (2014). *Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40, 760-778. Recuperado el 4 de junio del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.104>
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria*. *Microbiology*, 111(1), 1-61. doi: 10.1099/00221287-111-1-1
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). *Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor*. *Biotechnol Bioeng*, 102(1), 100-112. doi: 10.1002/bit.22033
- Rojo-Cebreros, A. H., Morales-Plascencia, M. E., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J. M., & Medina-Jasso, M. A. (2016). Floculación de *Nannochloropsis* sp. inducida por hidróxido de sodio: eficiencia de floculación, efecto sobre la viabilidad microalgal y su uso como alimento para rotíferos. *Latin american journal of aquatic research*, 44(4), 662-670. Recuperado el 1 de abril del 2017 de <http://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-1>
- Ruiz, G. (2015). Instalación y Monitoreo de un Fotobiorreactor para el Cultivo Autotrófico y la Extracción de Lípidos de Microalgas *Chlorella* para la Producción de Biodiesel. Universidad San Francisco de Quito, 89. Recuperado el 27 de Marzo del 2017 de "<http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/4184>"
- Ruiz, J., Alvarez, P., Arbib, Z., Garrido, C., Barragan, J., & Perales, J. A. (2011). *Effect of nitrogen and phosphorus concentration on their removal kinetic in treated urban wastewater by Chlorella vulgaris*. *Int J Phytoremediation*, 13(9), 884-896. doi: 10.1080/15226514.2011.573823
- Sawin, J., Seyboth, K., Sverrisson, F. (2016). Energías Renovables 2016 Reporte de la situación Mundial. Recuperado el 11 de Mayo del 2017 de [http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2016/06/GSR\\_2016\\_KeyFindings\\_SPANISH.pdf](http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2016/06/GSR_2016_KeyFindings_SPANISH.pdf)
- Sawin, Seyboth, Sverrisson, (2017). Leading biodiesel producers worldwide in 2015, by country in billion liters. Recuperado el 4 de abril del 2017 de "<https://www.statista.com/statistics/271472/biodiesel-production-in-selected-countries/>"
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., . . . Hankamer, B. (2008). *Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production*. *Bioenergy research*, 1(1), 20-43. Recuperado el 27 de mayo del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-008-9008-8>
- Schwede, S., Kowalczyk, A., Gerber, M., & Span, R. (2011). *Influence of different cell disruption techniques on mono digestion of algal biomass*. Paper presented at the World Renewable Energy Congress-Sweden; 8-13 May; 2011; Linköping; Sweden. doi: 10.3384/ecp1105741

- Shin, H.-Y., Ryu, J.-H., Bae, S.-Y., Crofcheck, C., & Crocker, M. (2014). *Lipid extraction from Scenedesmus sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane*. Fuel, 130, 66-69. doi: 10.1016/j.fuel.2014.04.023
- Song, M., Pei, H., Hu, W., & Ma, G. (2013). *Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production*. Bioresour Technol, 141, 245-251. doi: 10.1016/j.biortech.2013.02.024
- Tang, X., Zheng, H., Gao, B., Zhao, C., Liu, B., Chen, W., & Guo, J. (2017). *Interactions of specific extracellular organic matter and polyaluminum chloride and their roles in the algae-polluted water treatment*. J Hazard Mater, 332, 1-9. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.02.060
- Tripathi, R., Singh, J., & Thakur, I. S. (2015). *Characterization of microalga Scenedesmus sp. ISTGA1 for potential CO2 sequestration and biodiesel production*. Renewable Energy, 74, 774-781. doi: 10.1016/j.renene.2014.09.005
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., & Hoadley, A. F. (2010). *Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement*. Chemical Engineering Journal, 162(3), 935-940. Recuperado en línea el 3 de junio del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.06.046>
- UTEX (2017) The University of Texas. *Culture Collection Algae*. Recuperado el 6 de junio del 2017 de [https://utex.org/pages/search-results?q=scenedesmus%20sp&page\\_num=2](https://utex.org/pages/search-results?q=scenedesmus%20sp&page_num=2)
- Veillette, M., Chamoumi, M., Nikiema, J., Faucheux, N., & Heitz, M. (2012). *Production of biodiesel from microalgae Advances in Chemical Engineering: InTech*. Recuperado el 1 de mayo del 2017 de [http://cdn.intechopen.com/pdfs/33981/intech-production\\_of\\_biodiesel\\_from\\_microalgae.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/33981/intech-production_of_biodiesel_from_microalgae.pdf)
- Vela, F. (2016). Remoción de mercurio en aguas residuales de la actividad minera con el uso de microalgas. Facultad de Ingenierías Ciencias Agropecuarias. Repositorio UDLA. Recuperado el 27 de Marzo del 2017 de " <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/4859>"
- Velasco, J. (2016). Evaluación de la captura de CO2 mediante biofiltros con la utilización de microalga. Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias. UDLA. Quito, 81. Recuperado el 27 de Marzo de del 2017 de " <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5741>"
- Vélez Tamayo, M. J. (2014). Estudio sobre el modelado y control de las condiciones óptimas de cultivo de microalgas en fotobiorreactores para producción de biodiésel. Recuperado el 26 de abril del 2017 de <http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/2826/Trabajo.pdf?sequence=1>
- Wehr, J. D., Sheath, R. G., & Kociolek, J. P. (2015). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*: Elsevier. Recuperado de 18 de abril del 2017 de <https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=yjnLAWAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Freshwater+algae+of+North+America:+ecology+and+classification&ots=FtWLSCErTF&sig=6JRCc6VZlbgalXoow9pHm8U11ro#v=onepage&q=Freshwater%20algae%20of%20North%20America%3A%20ecology%20and%20classification&f=false>



- Xin, L., Hu, H. Y., Ke, G., & Sun, Y. X. (2010). *Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp.* *Bioresour Technol*, 101(14), 5494-5500. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.016
- Yan, Y., Li, X., Wang, G., Gui, X., Li, G., Su, F., . . . Liu, T. (2014). *Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review.* *Applied Energy*, 113, 1614-1631. doi: 10.1016/j.apenergy.2013.09.029
- Yoo, G., Park, W. K., Kim, C. W., Choi, Y. E., & Yang, J. W. (2012). *Direct lipid extraction from wet Chlamydomonas reinhardtii biomass using osmotic shock.* *Bioresour Technol*, 123, 717-722. doi: 10.1016/j.biortech.2012.07.102

## **ANEXOS**

### Anexo 1. Composición del medio BG-11

Solución	Reactivo	Cantidad (g)
Solución 1 (para 1 L ) 10 ml.L-1	NaNO <sub>3</sub>	150
	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	7
	CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	3,6
Solución 2 (para 1 L ) 10 ml.L-1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3 H <sub>2</sub> O	4
	EDTA	0,1
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2
Solución 3 (para 1 L ) 10 ml.L-1	Ácido Cítrico	0,6
	Citrato de Sodio	0,6
Solución 4 (para 1 L ) 1 ml.L-1	H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
	MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	1,81
	ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,22
	NaMoO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,39
	CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,8
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,05
	FeCl <sub>2</sub>	0,22

### Anexo 2. Composición del medio Bold's Basal Medium – BBM

Componente	Solución Stock (g.L-1 H2O)	Cantidad mL para 1 L
<b>Macronutrientes</b>		
NaNO <sub>3</sub>	25	10
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	2	10
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	7,5	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5	10
NaCl	2,5	10
<b>Solución Alcalina EDTA</b>		
EDTA	50	
KOH	31	1
<b>Solución Ácida de Hierro</b>		
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	4,98	1
<b>Solución de Boro</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42	1
<b>Solución de metales traza</b>		
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	8,82	
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	1,44	
MoO <sub>3</sub>	0,71	
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	1,57	
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,49	1

### Anexo 3. Composición Química Nitrofoska® foliar

Compuesto		Cantidad
Nitrógeno	N	10%
Fósforo	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	4%
Potasio	K <sub>2</sub> O	7%
Magnesio	MgO	0,20%
Azufre	S	0,80%
Manganeso	Mn	17ppm
Hierro	Fe	140ppm
Cobre	Cu	25ppm
Zinc	Zn	5ppm
Boro	B	22ppm
Molibdeno	Mo	3ppm

#### **Anexo 4. Protocolo de Análisis de Grasa**

Basado en el Protocolo de Método de Extracción con Solventes (Sumersión) 39.1.08 Método oficial AOAC 991.36 Modificado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

##### **Preparación de Muestra**

- Dejar la muestra a temperatura ambiente
- Homogenizar la muestra agitando el envase antes de pesar.

##### **Procedimiento**

- Pesar 10 g de la muestra, añadir 60ml de ácido clorhídrico y 70 ml de agua.
- Someter a Hidrolisis mediante calentamiento a partir de que comienza a hervir tomar 30 min, todo el tratamiento se realiza dentro de la sorbona.

##### **Filtración**

- Enfriar la muestra
- Filtrar la muestra en papel filtro previamente humedecido.
- Lavar la muestra
- Secar la muestra a temperatura ambiente.
- Colocar en capuchones de celulosa

##### **Extracción**

- Pesar el vaso de extracción, previamente lavado y secado.
- Colocar los capuchones que contienen las muestras en las columnas de extracción
- Añadir éter dietílico dentro de las columnas de extracción hasta cubrir los capuchones.
- Calentar la muestra durante 25 min en el extractor de grasa E-AL-12
- Eliminar los restos de solvente y humedad.
- Pesar el vaso con el resultado obtenido

##### **Expresión de resultados**

$$grasa, \% = \frac{(B - C) \times 100}{A}$$

En donde


A= peso en gramos de la muestra

B= peso en gramos del vaso de extracción después del secado

C= peso en gramos del vaso de extracción antes de la extracción.

## Anexo 5. Protocolo de Análisis de Perfil lípidico

Basado en el Protocolo de Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos, Método oficial AOCS Ce 2-66. Modificado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS	PREPARACIÓN DE ÉSTERES METÍlicos DE ÁCIDOS GRASOS MÉTODO OFICIAL AOCS Ce 2-66	CODIGO: MAL-81
		PÁGINA: 3 DE 4
		REVISION: 1

- Extraer las grasas de los alimentos conforme el método de extracción de grasa establecido.
- El tamaño de la muestra necesita ser conocido sólo para determinar el tamaño del recipiente y las cantidades de reactivos a usarse, de acuerdo al siguiente cuadro:

Muestra (mg)	Volúmenes (ml)	NaOH 0.5 N, (ml)	BF <sub>3</sub> -metanol (ml)
100-250	50	4	5
250-500	50	6	7
500-750	125	8	9
750-1000	125	10	12

- Para ácidos grasos:
  - a) Introduzca la grasa extraída en matraces Erlenmeyers esmerilados de 50-125 ml. Adicione 5 ml de la solución NaOH-metanol, conecte a un equipo de destilación y deje en calentamiento de 5-10 minutos hasta que los glóbulos de grasa se disuelvan.
  - b) Adicione 5 ml del reactivo BF<sub>3</sub>- metanol a través del condensador y deje hervir por 2 minutos.
  - c) Remueva de la fuente de calor y del condensador.
  - d) Adicione 5 ml de hexano y aproximadamente 15 ml de solución de cloruro de sodio saturada.
  - e) Agite vigorosamente por 15 segundos.  
Si fuera necesario, adicione suficiente solución de cloruro de sodio saturada, para evitar emulsificación.
  - f) Dejar reposar en tubos de ensayo.
  - g) Recoger aproximadamente 1 ml de la fase sobrenadante (ésteres metílicos de ácidos grasos en hexano), en viales.
  - h) Leer en el equipo de cromatografía de gases.

### 9. CÁLCULOS Y EXPRESION DE RESULTADOS

El equipo emite un reporte y tomar los datos de Area porcentaje para reportar los valores de los esteres metílicos

### 10. REGISTRO DE RESULTADOS

Referencia OP-4.1-02 Procedimiento de derecho y confidencialidad del cliente y protección electrónica, registro de resultados, preinformes e informes, ítem 6.2.1 Manejo de los resultados

R-4.3-00 / Rev 1

Anexo 6. Resultado de Análisis de Grasas



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
 OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS

LABORATORIO DE ALIMENTOS  
 INFORME DE RESULTADOS

INF.LAB.ALIM- 24715  
 ORDEN DE TRABAJO No 51568

SOLICITADO POR:	CIE
DIRECCIÓN DEL CLIENTE:	REPUBLICA DEL SALVADOR N35-33 Y PORTUGAL -QUITO
MUESTRA DE:	MICROALGAS
DESCRIPCIÓN:	VER ABAJO
LOTE:	---
FECHA DE ELABORACIÓN:	---
FECHA DE VENCIMIENTO:	---
FECHA DE RECEPCIÓN:	11/12/2015
HORA DE RECEPCIÓN:	10:25
FECHA DE ANÁLISIS:	14-17/12/2015
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS A LA SECRETARIA:	21/12/2015
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	
COLOR:	Característico
OLOR:	Característico
ESTADO:	SOLIDO
Contenido:	10g
OBSERVACIONES:	
Los resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.	
MUESTREADO POR:	El Cliente

INFORME


CODIGO	UNIDAD	GRASA	METODO
A1- 001	%	2.40	MAL-03/ AOAC 991.36
A1.1.1 ✓	%	7.21	MAL-03/ AOAC 991.36
A3 - 001	%	2.51	MAL-03/ AOAC 991.36
B2 - 001 ✓	%	3.75	MAL-03/ AOAC 991.36
B2 - 009	%	3.57	MAL-03/ AOAC 991.36
D4 - 005	%	2.76	MAL-03/ AOAC 991.36
F1 - 003	%	1.93	MAL-03/ AOAC 991.36
H2 - 001	%	2.72	MAL-03/ AOAC 991.36
H2 - 002 ✓	%	3.51	MAL-03/ AOAC 991.36



X. *Geovany Garófalo*  
 Dr. Geovany Garófalo  
 JEFE ÁREA DE ALIMENTOS



**Anexo 7. Resultado de Análisis de Perfil lipídico**



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS**


**LABORATORIO DE ALIMENTOS**  
**INFORME DE RESULTADOS**


**INF.LAB.ALIM- 25476**  
**ORDEN DE TRABAJO No 54642**

SOLICITADO POR:	VALLADARES ROSARIO
DIRECCIÓN DEL CLIENTE:	PONCIANO ALTO
MUESTRA DE:	ACEITE
DESCRIPCIÓN:	ACEITE DE MICROALGAS
LOTE:	----
FECHA DE ELABORACIÓN:	----
FECHA DE VENCIMIENTO:	----
FECHA DE RECEPCIÓN:	08/12/2016
HORA DE RECEPCIÓN:	12:44
FECHA DE ANÁLISIS:	19-21/12/2016
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS A LA SECRETARÍA:	22/12/2016
<b>CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA</b>	
COLOR:	Característico
OLOR:	Característico
ESTADO:	LIQUIDO
Contenido:	20 ml
OBSERVACIONES:	
Los resultados que constan en el presente informe se refieren a la muestra entregada por el cliente al OSP.	
MUESTREADO POR:	El Cliente

**PERFIL LIPIDICO**

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	METODO
Grasa	%	100.00	MAL-03/ AOAC 991.36
<b>ACIDOS GRASOS</b>			
Acido Palmítico	C16:0	% 8.55	Cromatografía de Gases
Acido Palmíticooleico	C16:1	% 0.53	Cromatografía de Gases
Acido Esteárico	C18:0	% 2.75	Cromatografía de Gases
Acido Oléico	C18:1n9 cis ω9	% 55.97	Cromatografía de Gases
Acido Linoléico	C18:2n6 cis ω6	% 23.97	Cromatografía de Gases
Acido γ- Linolenico	C18:3n6 ω6	% 7.50	Cromatografía de Gases
Acido cis-11 eicosenoico	C20:1	% 0.74	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Saturados		% 11.30	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Insaturados		% 88.70	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Monoinsaturados		% 57.23	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos Poliinsaturados		% 31.47	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos TRANS		% 0.00	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos omega 3 y 6		% 31.47	Cromatografía de Gases
Total ácidos grasos		% 100.00	Cromatografía de Gases





Dr. Geovany Garofato  
**JEFE ÁREA DE ALIMENTOS**



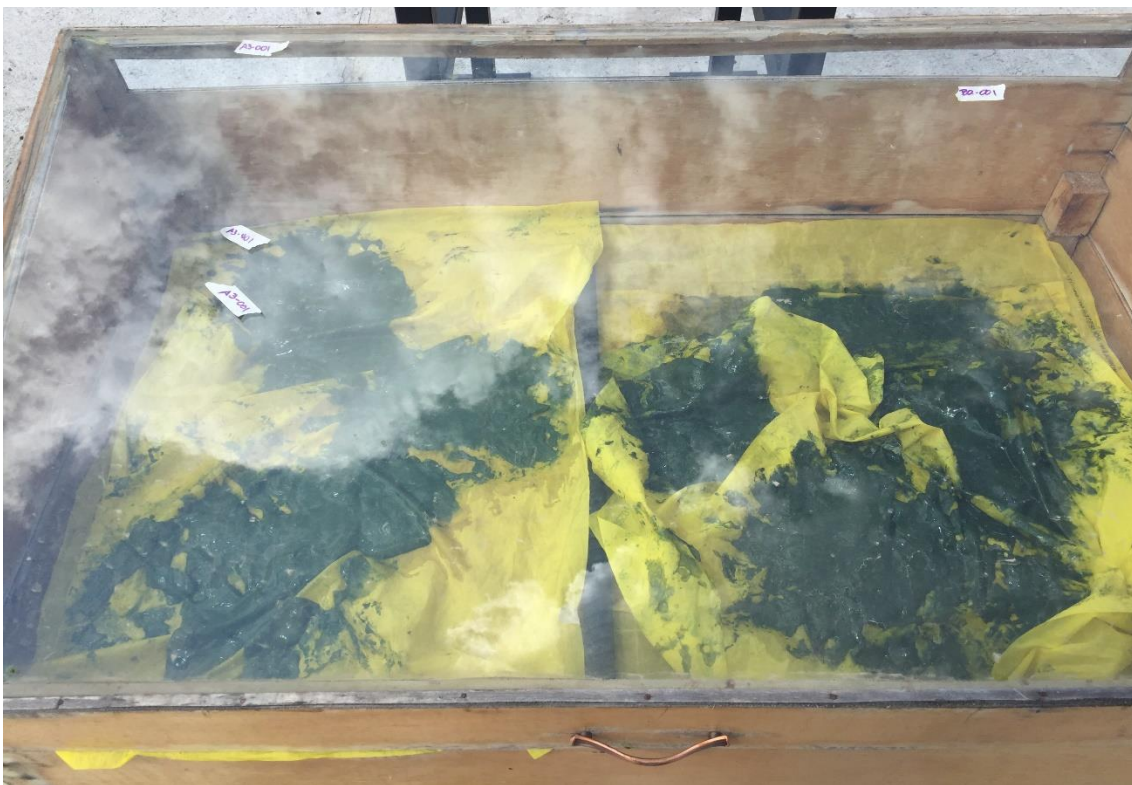
Anexo 8. Escalado de microalgas a nivel de laboratorio



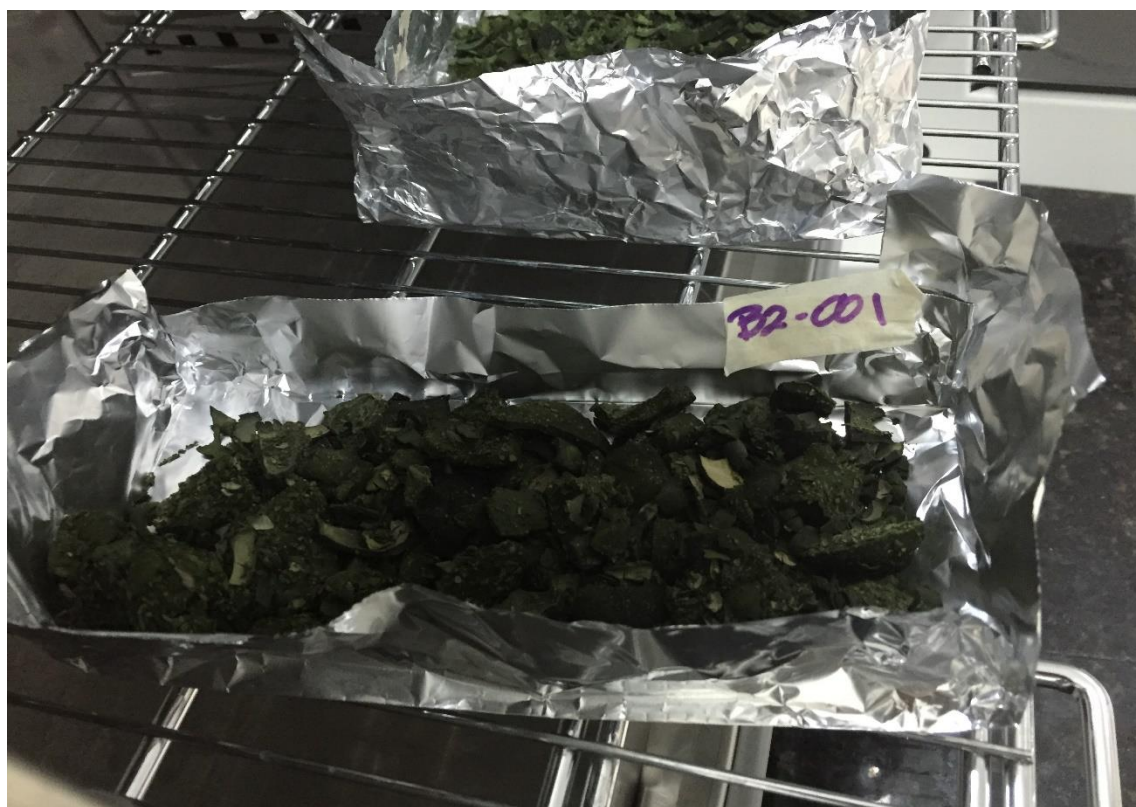
**Anexo 9. Cultivo en fotobiorreactores en forma de "V" de 40L, previo a la cosecha.**



**Anexo 10. Secado de biomasa en panel solar.**



Anexo 11. Biomasa Seca.



Anexo 12. Extracción lipídica en Soxhlet



