



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ingeniería

Escuela de Ingeniería Civil

***“EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE
BIODIESEL DE MICROALGAS DE LAGUNAS DE TRATAMIENTO
DE AGUA RESIDUAL”***

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO CIVIL**

AUTORES:

María José Pérez Torres.
Jenny Alexandra Quishpi Machuca.

DIRECTOR:

Ing. Andrés Omar Alvarado Martínez, PhD.

CUENCA- ECUADOR

Diciembre 2014



Resumen

El agotamiento gradual de las reservas mundiales fósiles y el impacto ambiental de las emisiones de dióxido de carbono, ha impulsado la búsqueda de fuentes de combustibles renovables y amigables con el ambiente. Las microalgas han sido consideradas como una prometedora potencial fuente de combustible renovable que podría sustituir a los combustibles fósiles. En esta investigación se controló el crecimiento de 5 diferentes cultivos de familias de microalgas: *Chorella*, *Scenedesmus*, y tres familias aisladas pero no indentificadas llamadas F.F Especie 1, F.F Especie 3, y H1. Se realizó la extracción de lípidos de la biomasa con el método de extracción soxhlet usando 6 solventes que abarcan una amplia gama de polaridades y solubilidades. La metodología de extracción implicó el uso de solventes individuales y mezclas de solventes seleccionadas binarias. El análisis mostró que las mezclas más eficientes para la extracción de lípidos más clorofila fue metanol:hexano (1:3) y cloroformo:metanol (1:2), con una producción de contenidos de lípidos mayores al 13%. La familia *Chlorella* mostró la mayor concentración de lípidos con un promedio de 20.37% seguida por la familia *Scenedesmus* con un promedio de 20.10%. Se aplicó un pretratamiento de disrupción celular térmico (autoclave) y físico (liofilización) a la biomasa de la microalga *Chlorella* y se comparó la productividad de lípido con respecto a la biomasa sin pretratamiento. Los resultados no mostraron un aumento considerable. Se comparó finalmente la productividad de lípido al disminuir el suministro de nutrientes al cultivo de microalgas resultando en un aumento de la concentración de lípido pero una disminución de la producción total, recomendándose más investigaciones en este sentido.

Palabras Clave: microalgas, lípidos, biocombustible, biodiesel, energía renovable, lagunas de algas de alta tasa, lagunas de estabilización, disrupción celular, extracción soxhlet, solvente.



Abstract

The decreasing of fossil fuel reserves and the environmental impact of carbon dioxide emissions, has encouraged the search for environmentally friendly and renewable fuel sources. Microalgae has been regarded, in this sense, as a promising renewable fuel source for the future. In this research, five different families of microalgae were cultured: *Chorella*, *Scenedesmus*, and three isolated but unidentified families. Lipid extraction of the algae biomass was performed using soxhlet extraction method, using six solvents which cover a wide range of polarities and solubilities. The extraction methodology implied the use of single solvents and some selected binary solvent mixtures. The analysis showed that the binary solvent mixtures: methanol:hexane (1:3) and chloroform:methanol (1:2) were the most efficient in the extraction of lipids, producing lipid contents above 13%. *Chlorella* family showed the highest concentration of lipids with an average of 20.37%, followed by the *Scenedesmus* family with an average of 20.10%. A thermal pretreatment of cell disruption (autoclave) and physical disruption (lyophilization) were performed to the *Chlorella* microalgae and compared to undisrupted cells, showing no significant increase. Finally, the global productivity of the lipids were assessed by means of decreasing the nutrient availability in the culture, showing an increase of the lipid concentration in the algae cells but a substantial decrease in the total lipid productivity. More research efforts are suggested in this regard.

Keywords: microalgae, lipids, biofuels, biodiesel, renewable energy, high rate algal ponds, waste stabilisation ponds, cellular disruption, soxhlet extraction, solvent.



Tabla de Contenido

Resumen.....	1
Abstract	2
Agradecimiento	15
Dedicatoria.....	16
CAPITULO 1.....	17
1. INTRODUCCION.....	17
1.1. Objetivos	19
1.1.1. Generales.....	19
1.1.2. Específicos.....	19
1.2 Descripción General	20
CAPITULO 2.....	21
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	21
2.1 Métodos Alternativos sustentables o sostenibles energéticos	21
2.1.1 Fuentes de Energía Renovable Sostenible	21
2.2 Biocombustibles.....	22
2.2.1 Generalidades	22
2.2.2 Clasificación de los Biocombustibles.....	23
2.2.3 Potencial de los Biocombustibles.....	26
2.3 Microalgas como fuente de Biocombustible	28
2.3.1 Introducción	28
2.3.2 Generalidades de las Microalgas.....	28
2.3.3 Potencial de los combustibles a partir de Microalgas.....	29
2.3.4 Producción de Biocombustibles de Microalgas	30



2.3.5	Métodos de Extracción de aceite	36
2.3.6	Factores de productividad y de producción de biocombustibles de microalgas.....	39
2.4	Sistemas Lagunares	41
2.4.1	Generalidades	41
2.4.2	Lagunas de Estabilización (WSP)	42
2.4.3	Lagunas de Algas de Alta Tasa (HRAP)	47
CAPÍTULO 3.....		52
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
3.1	Familias de Algas estudiadas.....	54
3.2	Control de las condiciones que afectan el crecimiento en el cultivo de microalgas.....	56
3.2.1	Materiales utilizados para el control de las condiciones.....	56
3.2.2	Procedimiento para el cultivo de microalgas.....	58
3.2.3	Procedimiento para el control de las condiciones de cultivo	59
3.3	Cosecha de Biomasa para la producción de biodiesel.....	60
3.3.1	Medición de turbiedad.....	60
3.3.2	Sedimentación.....	61
3.3.3	Centrifugación	62
3.3.4	Filtración.....	62
3.4	Pretratamiento de la biomasa algal	63
3.4.1	Secado al horno y trituración de la biomasa algal.....	63
3.5	Metodología de extracción de lípidos y protocolos de experimentación con microalgas.....	64
3.5.1	Materiales y procedimiento de extracción con el método Soxhlet.....	64



3.5.2	Selección de solventes orgánicos.....	71
3.5.3	Productividad de lípidos con las microalgas <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> cultivadas bajo diferentes condiciones de nutrientes.....	73
3.5.4	Pretratamiento de disrupción celular térmico.....	73
CAPITULO 4.....		76
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	76
4.1	Condiciones ambientales para el crecimiento de microalgas.....	76
4.2	Producción de Biomasa algal.....	77
4.2.1	Cosecha	77
4.2.2	Sedimentación	78
4.2.3	Centrifugación.....	79
4.2.4	Filtración y secado	79
4.3	Cuantificación de la composición oleaginosa de distintas familias de microalgas..	80
4.3.1	Temperatura de Equipo Soxhlet.....	80
4.3.2	Extracción de lípidos con multisoventes de varias familias de microalgas....	81
4.3.3	Productividad de lípidos bajo diferentes condiciones de nutrientes.....	91
4.3.4	Pretratamiento de disrupción celular.....	92
CAPITULO 5.....		94
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	94
ANEXOS		101



Lista de Tablas

Tabla 1. Tipos Comunes de Energía Renovable.	22
Tabla 2. Contenido de Aceites de algunas Microalgas (Chisti, 2007)	40
Tabla 3. Ventajas y desventajas de WSP	43
Tabla 4. Especies de algas presentes en lagunas facultativas y de maduración (A. Alvarado, 2013).....	46
Tabla 5. Caracterización de las Familias de Microalgas estudiadas.	55
Tabla 6. Propiedades relevantes de los solventes usados (Ramluckan et al., 2014)...	72
Tabla 7. Monitoreo de turbiedad de un cultivo de las familias de microalgas.	78
Tabla 8. Temperatura en Equipo Soxhlet.	80
Tabla 9. Monitoreo de turbiedad de un cultivo de las familias <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> en condiciones de estrés.....	91
Tabla 10. Porcentaje de lípido más clorofila en la primera y segunda etapa de cultivo con diferentes condiciones de cultivo para las familias <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>	92
Tabla 11. Porcentajes de lípido más clorofila obtenido con pretratamientos de disrupción celular térmico y mecánico.	93



Lista de Figuras

Figura 1. Clasificación de Biocombustibles. Adaptada de (Dragone et al., 2010; Mosquera Martínez & Merino Ruesga, 2006)	24
Figura 2. Reacción de Transesterificación de aceite para obtener biodiesel (Martínez-Alcalá).	26
Figura 3. Proceso integrado de producción de biodiesel y bioetanol a partir de microalgas (Garibay et al., 2009).	31
Figura 4. Sistemas para producción de microalgas. (a) Sistema tipo 'circuito': tipo de sistema con paletas giratorias para la circulación del agua. (b) Fotobioreactor tubular (Bošnjaković, 2013).	32
Figura 5. Equipo Soxhlet	38
Figura 6. Configuración Típica de una Laguna de Estabilización (WSP) (Janssens, 2010).	44
Figura 7. Configuración de un sistema avanzado de lagunas (APS) (Craggs et al., 2004).	48
Figura 8. Etapas experimentales llevadas a cabo para la producción a escala de laboratorio de biodiesel de microalgas utilizando el método de extracción Soxhlet.	53
Figura 9. Especies de Microalgas. (a)Chlorella. (b)Scenedesmus. (c)F.F. Especie 1. (d)H1. (e)F.F. Especie 3.	54
Figura 10. Materiales usados para el control de condiciones ambientales. (a) Reactor Cilíndrico de 3.5 y 1.5 litros. (b) Sistema de Agitación. (c) Sistema de iluminación fluorescente. (d) Compresor de aire. (e) Manguera y difusor de oxígeno. (f) pH metro YSI MultiLab IDS 4010-2.	57
Figura 11. Componentes del medio de cultivo. (a) Bicarbonato de sodio. (b) Carbonato de Sodio. (c) Nutrientes. (d) Balanza de precisión de 0.0001 g. (e) Cápsula de vidrio.	58
Figura 12. Medida de pH.	60
Figura 13. Procedimiento de medición de la turbiedad. (a)Toma de muestras. (b)Muestra en cubeta. (c)Medición de turbiedad.	61
Figura 14. Sedimentación. (a) Separación del cultivo de los bioreactores. (b) Refrigeración de matraces para la sedimentación.	61
Figura 15. Centrifugación. (a) Tubo de plástico de 50 ml. (b) Separación de microalgas	



por centrifugación.	62
Figura 16. Filtración. (a) Bomba de succión y filtro de porcelana. (b) Filtro Whatman de papel. (c) Muestra filtrada. (d) Biomasa en caja petri.	63
Figura 17. Pretratamiento de biomasa algal. (a) Biomasa algal colocada en el horno. (b) Biomasa sin contenido de agua.	64
Figura 18. Preparación de Balón de Ebullición. (a)Equipo Soxhlet. (b)Balón de ebullición vacío en la estufa. (c)Balón de ebullición vacío en el desecador.	65
Figura 19. Preparación de cartucho para la extracción. (a) Peso de cartucho con biomasa algal. (b) Colocación de cartucho en equipo Soxhlet.	65
Figura 20. Preparación de solvente. (a)Volúmen. (b)Solventes. (c)Colocación de solvente en equipo Soxhlet. (d)Equipo de protección.	66
Figura 21. Baño termostático.....	67
Figura 22. Equipo Soxhlet ensamblado para extracción.....	67
Figura 23. Medida de la Temperatura. (a)Termómetro Infrarrojo. (b)Botón de termostato.....	68
Figura 24. Obtención de lípido algal. (a)Solvente transparente dentro de la cámara de extracción. (b)Retiro del cartucho con residuo algal.....	69
Figura 25. Recuperación de solvente. (a)Recuperación de solvente. (b)Envases Herméticos. (c)Almacenamiento de solventes.	70
Figura 26. Separación del solvente del lípido algal. (a)Secado en el horno del balón de ebullición con lípido algal. (b)Desecación del balón de ebullición con lípido algal. (c)Peso del balón de ebullición con lípido algal seco.	70
Figura 27. Equipo de Liofilización	74
Figura 28. Autoclavado. (a)Equipo. (b)Muestra de biomasa.	75
Figura 29. Reactor homogenizado por el sistema de agitación.	77
Figura 30. Sedimentación de microalgas en 1 día. (a)Familia H1. (b)Familia F.F. Especie 3.	79
Figura 31. Temperatura del Equipo Soxhet.	81
Figura 32. Porcentaje de lípido y clorofila extraído por el método Soxhlet utilizando, solventes individuales y mezclas binarias para la familia Chlorella.	83
Figura 33. Porcentaje de lípido y clorofila extraído por el método Soxhlet utilizando,	



solventes individuales y mezclas binarias para la familia Scenedesmus.....	85
Figura 34. Porcentaje de lípido y clorofila extraído por el método Soxhlet utilizando, solventes individuales y mezclas binarias para las familias (a) F.F. Especie 3, (b) F.F. Especie 1 y (c) H1.	87
Figura 35. Porcentaje de lípidos más clorofila con las cuatro mezclas de solvente más eficiente de extracción. (a)cloroformo:metanol (1:2). (b)metanol:hexano (1:3). (c)etanol. (d)cloroformo:etanol (1:3).....	90



Lista de Siglas

APS	Advanced Pond System
AFPs	Advanced Facultative Ponds
ASPs	Algae Settling Ponds
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DIUC	Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca
FAME	Fatty Acid Methyl Ester (biodiesel)
FFA	Free Fatty Acid
GEI	Emisiones de Gases de efecto Invernadero
GHG	Greenhouse Gas
GL	Glicolípidos
HRAP	High Rate Algal Pond
HRAPr	High Rate Algal Pond with algal recycling
HRAPc	High Rate Algal Pond without algal recycling
HRT	Tiempo de Retención Hidráulico
LabVIEW	Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
MP	Maturation Pond
PTARs	Plantas de Tratamiento de Agua Residual
OD	Oxígeno Disuelto
PL	Fosfolípidos
RSU	Residuos Sólidos Urbanos
SFE	Supercritical Fluid Extraction
SWE	Subcritical Water Extraction
TG	Triglicéridos
VLIR	Vlaamse Interuniversitaire Raad (Consejo de Universidades Flamencas)
WSP	Waste Stabilisation Ponds



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

María José Pérez Torres, autora de la tesis "Evaluación cuantitativa de la producción de biodiesel de microalgas de lagunas de tratamiento de agua residual", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 1 de Diciembre del 2014

María José Pérez Torres

C.I: 0302297502



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

María José Pérez Torres, autora de la tesis "Evaluación cuantitativa de la producción de biodiesel de microalgas de lagunas de tratamiento de agua residual", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Civil. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 1 de Diciembre del 2014

María José Pérez Torres

C.I: 0302297502



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Jenny Alexandra Quishpi Machuca, autora de la tesis "Evaluación cuantitativa de la producción de biodiesel de microalgas de lagunas de tratamiento de agua residual", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 1 de Diciembre del 2014

Jenny Alexandra Quishpi Machuca

C.I:0106651243



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Jenny Alexandra Quishpi Machuca, autora de la tesis "Evaluación cuantitativa de la producción de biodiesel de microalgas de lagunas de tratamiento de agua residual", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Civil. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 1 de Diciembre del 2014

Jenny Alexandra Quishpi Machuca

C.I: 0106651243



Agradecimiento

Dejamos constancia de nuestro sincero agradecimiento al Ing. Andrés Alvarado Martínez, director de tesis, por su valiosa orientación paciencia y apoyo brindado, durante el período de desarrollo de la presente investigación.

A todo el personal del laboratorio de la Facultad de Ingeniería. De manera especial a Fernanda, Alexandra, Mariela, Daniela y Gabriela por el apoyo y ánimo para la realización de este proyecto.

Agradecemos también a la Dra. Guillermina Pauta por compartir sus conocimientos y sugerencias para la elaboración de nuestro trabajo.

A los profesores de la Facultad por ser guía intelectual durante los 6 años de estudio. Una mención especial al Ing. Esteban Pacheco, quien con su motivación ayudó a la culminación exitosa del presente proyecto.

Las autoras



Dedicatoria

Dedico esta tesis a Dios por haberme permitido alcanzar este logro, a mi madre Lucia por su apoyo, sus consejos, valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su amor incondicional día tras día. A mi padre Jaime, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y por el valor mostrado para salir adelante ante cualquier circunstancia. A mis hermanos Toño y Jaime, así como a mi cuñada Priscila por sus consejos, apoyo y confianza brindados. A mis sobrinos Camilo, Cisne y Toño por brindarme días llenos de sonrisas con su ternura y ocurrencias, a todos mis demás familiares que de una u otra forma han estado pendientes a lo largo de toda mi carrera universitaria.

A mis queridos amigos por el apoyo brindado, en especial a Jenny por su paciencia y dedicación empleada para la culminación exitosa de nuestro proyecto y a mi enamorado por su infinita confianza, paciencia y ánimo brindado hasta el final de la culminación de mi carrera, día a día.

Majo

Dedico esta tesis a mis queridos padres Olga y Rubén por ser el pilar fundamental de mi vida, por su apoyo incondicional y paciencia a lo largo de mi carrera universitaria; a mis hermanas Cris, Pao y Valery por su comprensión, paciencia y el ánimo que me dieron para culminar con mis estudios; y a todos mis demás familiares que siempre han estado apoyándome, en especial a mis abuelitos por estar siempre pendientes de mí y a mi primo Santy por su apoyo incondicional.

A mis amigos; en especial a María José, mi compañera de tesis, y su enamorado por la paciencia brindada a lo largo de la elaboración de nuestro trabajo. Dedico también esta tesis a mi buen amigo Daniel por su apoyo y el ánimo brindado.

Jenny



CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El rápido incremento de la concentración de dióxido de carbono (CO_2) en la atmósfera combinado con el desgaste de las reservas de combustibles fósiles ha conducido a un mayor interés comercial en las fuentes de energía renovables (Halim, Danquah, & Webley, 2012). Dentro de las varias alternativas tecnológicas, la producción de biocombustibles ha recibido mucho interés científico en las últimas décadas. La producción a gran escala de biocombustible usando lagunas de algas de alta tasa (HRAP's) para tratamiento de agua residual fue propuesta por primera vez por Oswald and Golueke (1960). La biomasa algal producida y cosechada de estos sistemas de tratamiento de agua residual puede ser convertida en biocombustible mediante varias maneras, por ejemplo digestión anaerobia a biogás, transesterificación de lípidos a biodiesel, fermentación de carbohidratos a bioetanol y conversión a altas temperaturas en aceite biológico crudo (Park, Craggs, & Shilton, 2011).

Las microalgas tienen una capacidad de crecer rápidamente, sintetizar y acumular grandes cantidades de lípidos. Una industria a base de aceite de algas exitosa y económicamente viable dependerá de la selección de cepas apropiadas de microalgas y la selección del mejor método de extracción de lípidos (Araujo et al., 2013). Una alternativa altamente fiable es el biodiesel producido mediante transesterificación de lípidos extraídos de microalgas, con una huella de carbono neutral, siendo una tecnología que no compite con cultivos agrícolas tradicionales. Sin embargo, existe una alta variabilidad entre las especies de microalgas referente a su capacidad para sintetizar sustancias oleaginosas que depende en gran medida de las características ambientales y concentración de nutrientes del medio que las sustenta (Abou-Shanab, Hwang,



Cho, Min, & Jeon, 2011; Amaro, Guedes, & Malcata, 2011).

Los métodos actuales de cultivo de microalgas para producción de biocombustibles resultan costosos (Jonker & Faaij, 2013), por lo que una alternativa económica y ambientalmente viable sería aprovechar los efluentes WSP y HRAP, que contienen altas concentraciones de estos microorganismos (Durazno, 2009), con una notable reducción de la huella de carbono global generada por el sistema de tratamiento.

La tesis plantea como objetivo principal analizar el potencial aprovechamiento de los lípidos de las microalgas como biocombustibles con procedimientos gravimétricos; controlando los parámetros ambientales más importantes de las microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual.

Para la realización de la tesis se plantea usar muestras de diferentes especies de microalgas como, *Chorella* y *Scenedesmus*, procedentes de la PTAR ubicada en el sector Ucubamba, y de diferentes embalses del Parque Nacional "El Cajas". En una tesis previa se ha logrado cultivar con éxito estas y otras especies que serán utilizadas en el proceso de experimentación. La extracción de lípidos se realizará con el ensayo Soxhlet, en el laboratorio de sanitaria de la Facultad de Ingeniería.

Este proyecto representa una fase inicial de investigación que permitirá establecer futuras líneas de investigación para aprovechar las nuevas fuentes de energía renovable como el biocombustible, producido mediante la extracción de lípidos de microalgas en las condiciones expuestas de la serranía ecuatoriana.



1.1 Objetivos

1.1.1 Generales

1.1.1.1 Contribuir al conocimiento científico y práctico respecto de las microalgas presentes en varios sistemas naturales.

1.1.1.2 Conocer y analizar la composición de lípidos y la cinética de diferentes microalgas.

1.1.2 Específicos

1.1.2.1 Analizar y controlar parámetros ambientales para el óptimo crecimiento de las microalgas.

1.1.2.2 Realizar un análisis cuantitativo de la composición de lípidos de varias familias de microalgas para su potencial uso como biocombustibles con procedimientos gravimétricos.

1.1.2.3 Determinar la eficiencia de extracción usando diferentes solventes para la extracción de lípidos a partir de biomasa algal con el método Soxhlet.

1.1.2.4 Estudiar la productividad de lípidos con las microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* cultivadas bajo diferentes condiciones de nutrientes.

1.1.2.5 Aplicar un pretratamiento de disrupción celular térmico y físico a la biomasa de la microalga *Chlorella* y comparar la productividad de lípido con respecto a la biomasa sin pretratamiento.



1.2 Descripción General

El presente documento inicia con una revisión de literatura enfocada en la producción de biodiesel a partir de microalgas, donde se detalla el potencial, las diferentes tecnologías para la producción de biomasa algal y los sistemas lagunares en donde estas pueden crecer. Posteriormente en el capítulo 3 se detalla los materiales y métodos utilizados en los procedimientos experimentales tanto para la producción de biomasa algal como para la extracción de lípidos. Los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación se muestran en el capítulo 4 donde se incluye una discusión de los mismos y se hace una comparación de éstos con diferentes bibliografías. Finalmente se encuentra conciso en el capítulo 5 las conclusiones y recomendaciones derivadas de este proyecto de investigación que podrá establecer futuras líneas de investigación para aprovechar las nuevas fuentes de energía renovable como el biocombustible. Por último se enlistan las referencias citadas a lo largo del documento.



CAPÍTULO 2

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Métodos Alternativos sustentables o sostenibles energéticos

Uno de los grandes impactos que ha tenido el ser humano en el mundo son las diversas consecuencias del uso de recursos naturales para asegurar un abasto de energía apropiado para así sostener el desarrollo económico, tecnológico, y los patrones de consumo de las grandes potencias en los últimos siglos (Perez, 2008). Puesto que las fuentes fósiles de energía son limitadas, convirtiéndose en insostenibles por la disminución en todo el mundo, y agravado por el impacto ambiental de las emisiones de CO₂ y las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Sandoval, 2010), es inevitable sustituirlas por fuentes renovables de energía (Hackenberg, 2008) y amigables con el ambiente (Ramluckan, Moodley, & Bux, 2014).

Cambiar el sistema energético hacia las energías renovables es en principio posible; el sol y el viento representan una cantidad de energía que supera mil veces la demanda anual de energía de toda la economía mundial. El desafío consiste en desarrollar tecnologías adecuadas para su aprovechamiento sostenible (Hackenberg, 2008). De igual forma, los biocombustibles renovables y neutros de carbono han crecido en forma importante ambiental y económicamente como combustibles sostenibles (Ramluckan et al., 2014). Las estrategias energéticas no deberían limitarse sólo al uso de energía renovable, sino también debe incluir medidas agresivas de conservación y eficiencia energética (Perez, 2008).

2.1.1 Fuentes de Energía Renovable Sostenible

Los Suministros de energía renovable y sostenible son ambientalmente deseables a diferencia de los combustibles fósiles y de fisión. Ejemplos típicos

incluyen: Energía Eólica, Energía Solar, Energía marina y de mareas, Células de combustión y Biocombustibles; como se muestra en la Tabla 1 (Kennedy, 2009).

Tabla 1. Tipos Comunes de Energía Renovable.

Tipos Comunes de Energía Renovable	
Energía Eólica	Construcción de molinos de viento y parques eólicos para aprovechar el viento tanto en tierra como en mar.
Energía Solar	Existen varias tecnologías tales como: equipo fotovoltaico, equipo solar térmico, eléctrico fotovoltaico y espejos para aprovechar la radiación solar, estanques solares.
Conversión de Residuos	Gas de relleno sanitario, Producción de Metano, Conversión de residuos domésticos típicos, residuos agrícolas y residuos industriales.
Energía de olas	Generación de electricidad a partir de la energía natural de los océanos, energía de las mareas, olas y generadores actuales, y presas de marea.
Energía Mareomotriz	Aprovechar el movimiento regular de las mareas por presas o ruedas de agua de marea.
Tecnologías de Células de Combustible	Dispositivo de conversión de energía que genera electricidad y calor combinando electroquímicamente un combustible gaseoso y un gas oxidante, CHP (combinación de calor y energía); varios tipos.
Bombas de Calor :	Transferencias de calor desde el suelo a un edificio, etc.
Biocombustibles	Plantas de conversión (de caña de azúcar y de remolacha, maíz, habas de soya, lino, colza, camilina, etc.) para aprovisionar de combustible para el transporte, aviones y centrales eléctricas.

Producción y aplicaciones de hidrógeno como combustible de vehículos a motor.

(Boudghene Stambouli & Traversa, 2002; Kennedy, 2009; Perez, 2008)

2.2 Biocombustibles

2.2.1 Generalidades

El rápido incremento de la concentración de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera combinado con el desgaste de las reservas de combustibles fósiles ha conducido a un mayor interés comercial en las fuentes de energía renovables. Dentro de las varias alternativas tecnológicas, la producción de



biocombustibles ha recibido mucho interés científico en las últimas décadas (Halim et al., 2012).

Los biocombustibles pueden ser definidos como cualquier combustible producido a partir de biomasa y de algunas fuentes de energía renovables ya sea para el transporte o propósitos de quema. Estos pueden producirse a partir de productos agrícolas y forestales como azúcar, trigo, maíz o semillas oleaginosas, también incluye la madera y cantidades biodegradables de las industrias y residuos municipales, así como el estiércol (Dufey, 2006; Koizumi, 2014). Las microalgas han surgido como una opción promisoría para la producción de biodiesel (Fernández, Montiel, Milán, & Badillo, 2012), debido a que pueden producir una variedad de compuestos valiosos tales como los ácidos grasos, su capacidad de producir biomasa y su logro en la captura de CO₂ (Glembin, Kerner, & Smirnova, 2013).

2.2.2 Clasificación de los Biocombustibles

Los biocombustibles hacen referencia a los combustibles sólidos, líquidos o gaseosos derivados de materia orgánica. Por lo general, se dividen en biocombustibles primarios y secundarios (Figura 1) (Dragone, Fernandes, Vicente, & Texeira, 2010).

Los biocombustibles primarios constituidos por materias lignocelulosas procedentes del sector agrícola o forestal y de las industrias de transformación que producen residuos de dicha naturaleza como la leña (Mosquera Martínez & Merino Ruesga, 2006), se utilizan en forma no procesada principalmente para la calefacción, la cocina o la producción de electricidad. Los biocombustibles secundarios, siendo los principales el bioetanol y el biodiesel (Mosquera Martínez & Merino Ruesga, 2006) son producidos por el procesamiento de biomasa y son capaces de ser utilizados en diversos procesos industriales y en vehículos (Dragone et al., 2010), y representan cerca del 90 % del

biocombustible usado a nivel global (Dufey, 2006).

Los biocombustibles secundarios se pueden clasificar en tres generaciones: biocombustibles de primera, segunda y tercera generación (Figura 1) sobre la base de diferentes parámetros, tales como el tipo de tecnología de procesamiento, el tipo de materia prima o su nivel de desarrollo (Dragone et al., 2010).

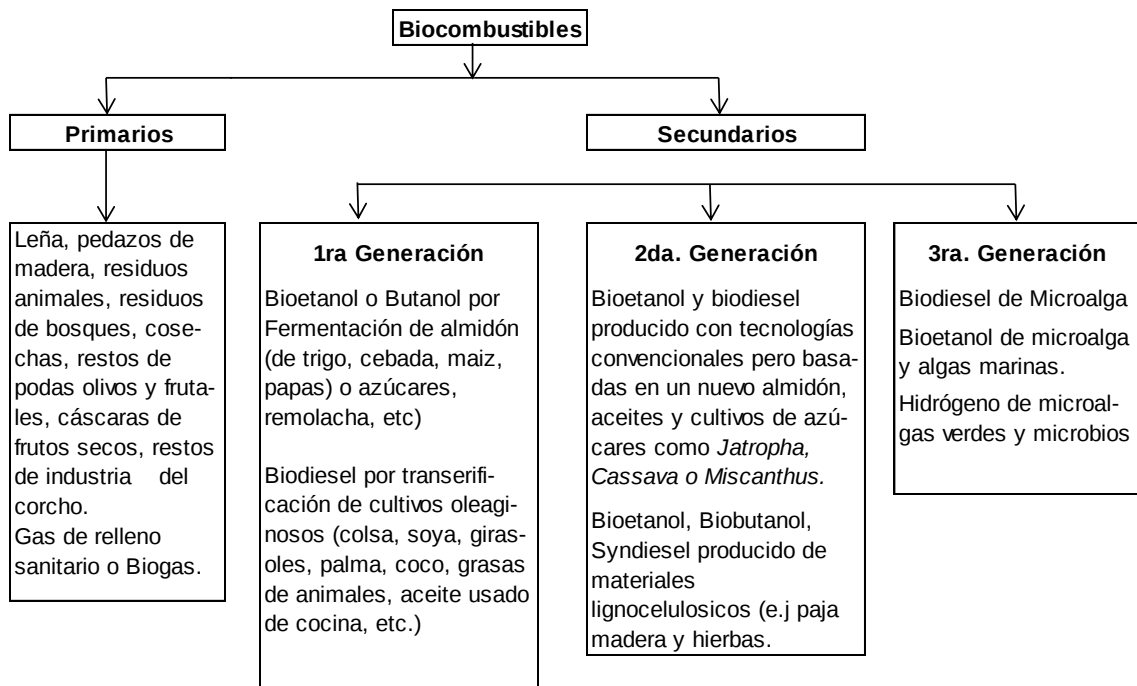


Figura 1. Clasificación de Biocombustibles. Adaptada de (Dragone et al., 2010; Mosquera Martínez & Merino Ruesga, 2006)

La digestión de la biomasa en condiciones anaerobias da origen al llamado *biogás* o *biometano*, producto de alto valor calórico. Este tipo de transformación se produce de manera espontánea en pantanos o fondos de lagunas y lagos en los que hay depósitos de materia orgánica. También se produce en los vertederos de residuos sólidos urbanos (RSU), donde se puede recuperar el gas mediante perforaciones (Mosquera Martínez & Merino Ruesga, 2006). El biogás se compone principalmente de una mezcla de metano (55-75%) y CO₂ (25-45%). Este puede ser usado como gas combustible y también ser



convertido para generar electricidad (Korres, O'Kiely, Benzie, & West, 2013).

El *bioetanol* es un combustible líquido similar a la gasolina que se obtiene como producto de la fermentación de materias vegetales ricas en azúcares o almidón o de biomasa lignocelulosa (Díez Bellido, 2013). En general, dos métodos son adoptados normalmente para la producción de bioetanol a partir de biomasa. El primero es un proceso bioquímico, es decir, la fermentación y la otra es por termo-química o gasificación. Un número de ventajas se han reportado en la producción de bioetanol a partir de algas. El proceso de fermentación implica menos consumo de energía y es mucho más simple en comparación con el sistema de producción de biodiesel. Adicionalmente, el CO₂ producido como un subproducto del proceso de fermentación puede ser reciclado como fuentes de carbono para el cultivo de microalgas, reduciendo así las emisiones de gases de efecto invernadero. Sin embargo, la tecnología para la producción comercial de bioetanol a partir de microalgas está todavía en desarrollo y se sigue investigando (Gendy & El-Temtamy, 2013).

2.2.2.1 Biodiesel

Biocombustible líquido compuesto de alquil-ésteres de alcoholes de cadena corta como etanol y metanol, con ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable: aceites vegetales (de girasol, colza, soya o palma), aceites usados (de fritura) (Zhang, 2003), grasas animales y aceites de microalgas (Fernández et al., 2012). La principal ventaja del biodiesel es que es uno de la mayoría de los combustibles renovables, no tóxico y biodegradable (Gendy & El-Temtamy, 2013).

Existen diversas metodologías para la producción de biodiesel: uso directo de aceites o mezclas de éstos con diésel fósil, microemulsiones, pirólisis y transesterificación, siendo esta última la solución más factible. La *transesterificación* es la reacción entre triglicéridos y un alcohol alifático de cadena corta especialmente el metanol para producir alquil-ésteres de ácidos grasos

(biodiesel) y glicerol como subproducto, previo tratamiento con hidróxido de sodio (Figura 2). Con una cantidad suficiente de aceite es factible su transformación en biocombustible (Aldo de la Cruz Benítez¹, Benito Reyes Trejo¹, Diana Guerra Ramírez, & Ramírez¹, 2013; Fernández et al., 2012; Martínez-Alcalá).

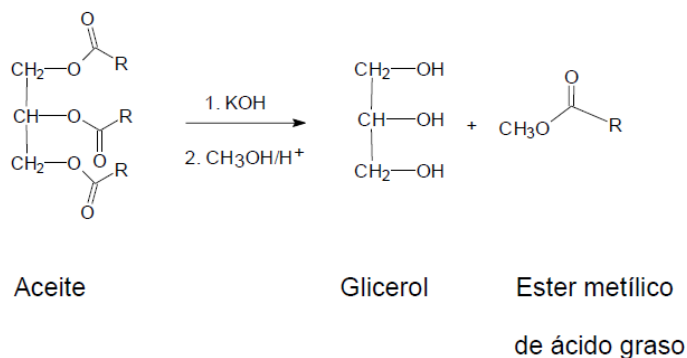


Figura 2. Reacción de Transesterificación de aceite para obtener biodiesel (Martínez-Alcalá).

2.2.3 Potencial de los Biocombustibles

Los biocombustibles tienen cuatro características principales. La primera al ser renovables, la energía derivada de estos puede ser repuesta a una velocidad más rápida que la energía que se consume. Las fuentes de combustible fósil se ven limitadas por las inexistencias de reservas, mientras que los biocombustibles son producidos a partir de una fuente de energía renovable; la biomasa. La segunda característica es que el uso de biocombustibles puede contribuir a la seguridad energética. Esto puede reducir la dependencia del petróleo de fuentes extranjeras de energía y también puede cambiar el gasto de las importaciones de energía extranjera a la energía producida en el país. La tercera característica es que se espera que los biocombustibles generen menor cantidad de emisiones de gases de efecto invernadero (GHG) que actualmente son producidos por combustibles fósiles. La última característica es que los biocombustibles pueden contribuir para impulsar el desarrollo rural y agrícola; creando nuevas oportunidades de trabajo y nuevas fuentes de ingreso para granjeros y áreas rurales. Estas características son los principales



incentivos para promocionar las políticas de biocombustibles en muchos países granjeros (Koizumi, 2014).

Aunque los procesos de biocombustibles tienen un gran potencial para proporcionar una ruta de carbono neutral para la producción de combustible, los sistemas de producción de primera generación tienen considerables limitaciones económicas y ambientales. La preocupación más común relacionada es que a medida que las capacidades de producción aumentan, también lo hace su competencia con la agricultura por las tierras de cultivo dedicadas a la producción de alimentos. El aumento de la presión sobre la tierra cultivable utilizada actualmente para la producción de alimentos puede conducir a la grave escasez de alimentos. Además, el uso intensivo de la tierra con las aplicaciones altas de fertilizantes y plaguicidas y el uso del agua pueden causar importantes problemas ambientales. La llegada de los biocombustibles de segunda generación está diseñada para producir combustibles a partir de biomasa lignocelulosa, la parte leñosa de plantas que no compiten con la producción de alimentos. Las fuentes incluyen los residuos agrícolas, residuos de cosecha forestal o de desechos de madera, tales como hojas, paja o virutas de madera, así como los componentes no comestibles de maíz o caña de azúcar. Sin embargo, la conversión de la biomasa de madera en azúcares fermentables requiere costosas tecnologías que implican un tratamiento previo con enzimas especiales, lo que significa que los biocombustibles de segunda generación aún no se pueden producir económicamente a gran escala. Por lo tanto, los biocombustibles de tercera generación derivados de microalgas se consideran como una energía alternativa viable que está desprovista de los principales inconvenientes asociados con la primera y segunda generación de biocombustibles. Las microalgas son capaces de producir 15 a 300 veces más aceite para la producción de biodiesel de los cultivos tradicionales en función de la superficie. Además en comparación con las plantas de cultivo convencionales que



normalmente se cosechan una vez o dos veces al año, las microalgas tienen un muy corto ciclo de cosecha (1-10 días dependiendo del proceso), lo que permite múltiples o continuas cosechas con un aumento significativo de los rendimientos (Dragone et al., 2010).

2.3 Microalgas como fuente de Biocombustible

2.3.1 Introducción

El uso de microalgas para la producción de biodiesel ha surgido como una opción prometedora, debido a que presentan mayor eficiencia fotosintética, son más eficaces en la asimilación de CO₂ y otros nutrientes con respecto a las plantas, y acumulan entre 20 y 80% de triglicéridos, entre otros (Chisti, 2008).

La producción de biodiesel a partir de los lípidos extraídos de microalgas, han sido considerados como una prometedora y potencial fuente de combustible renovable que podría sustituir a los combustibles fósiles (Ramluckan et al., 2014). Sin embargo, este enfoque todavía no se comercializa debido a altos costos de los procesos que están asociados con el tiempo y/o secado intensivo de energía, y los procesos de extracción de lípidos (Taher, Al-Zuhair, Al-Marzouqi, Haik, & Farid, 2014).

Cualquier proceso de producción de biocombustibles, que pueda sustituir con éxito un combustible convencional equivalente, debe cumplir tres requisitos básicos. En primer lugar, se debe producir suficiente materia prima para producir combustible a escala comercial, en segundo lugar debe costar menos que los combustibles fósiles convencionales, y por último, debe coincidir con las especificaciones estándar de calidad de los combustibles (Gendy & El-Temtamy, 2013).

2.3.2 Generalidades de las Microalgas

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariotas (cianobacterias) y eucariotas, capaces de convertir la



energía solar en energía química a través de la fotosíntesis, se localizan en diversos ambientes, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (Amaya & Sarmiento, 2010). Las microalgas, son *thallophytes* (plantas que carecen de raíces, tallos y hojas) que tienen clorofila tipo “a” como su pigmento fotosintético primario (Fernández et al., 2012; Hosikian, Lim, Halim, & Danquah, 2010).

2.3.3 Potencial de los combustibles a partir de Microalgas

En contraste con otras fuentes de materia prima para la producción de biocombustibles, los biocombustibles a base de algas tienen las siguientes ventajas:

- No tienen un impacto en el suministro de alimentos, al contrario de la primera generación de fuentes biocombustibles de aceite comestible como la soya, la palma y canola (Ramluckan et al., 2014).
- Pueden ser cultivadas en cualquier tierra disponible, agua o solución salina, incluso en agua residual de manera que no afecta el uso del suelo para otros propósitos mientras que fuentes no comestibles de segunda generación, como la *jatropha*, requieren grandes cantidades de tierra cultivable (Bošnjaković, 2013; Ramluckan et al., 2014), y su cultivo no requiere el uso de herbicidas o pesticidas (Peñarranda, Martinez Roldan, & Villanueva, 2013)
- Nutrientes para su cultivo (nitrógeno y fósforo, principalmente) se puede obtener a partir de aguas residuales; por lo tanto, hay una posibilidad para ayudar al tratamiento de aguas residuales municipales (Bošnjaković, 2013).
- Las microalgas, como las plantas, usan la luz solar y el proceso fotosintético para producir lípidos, pero lo hacen de manera más eficiente debido a su estructura simple además, que las células crecen en suspensión acuosa, y tienen un acceso más eficiente al agua, CO₂, y otros nutrientes (Brennan & Owende, 2010; Dragone et al., 2010; Ramluckan et al., 2014).
- El biocombustible resultante es completamente biodegradable y no contiene



sustancias nocivas como el azufre, no es tóxico.(Dragone et al., 2010).

- Tienen un rápido potencial de crecimiento, existen especies capaces de cuadruplicar su biomasa en un solo día (Hackenberg, 2008) y varias especies tienen porcentajes entre 20 a 50% de contenido de aceite del peso seco de biomasa (Bošnjaković, 2013).
- La producción de biomasa de microalgas puede fijar el CO_2 (1 kg de biomasa de algas fija aproximadamente 1,83 kg de CO_2).
- La biomasa de algas también se puede utilizar para la producción de alimento animal, etanol o metano. Los ácidos grasos libres que se forman a partir de la hidrólisis de los triacilgliceroles pueden ser utilizados en la cosmética e industria farmacéutica. El glicerol se puede utilizar para la síntesis de productos químicos o como una fuente de carbono para microorganismos.
- Cálculos teóricos estiman que las microalgas tienen el potencial para producir mayor cantidad de biomasa y de aceite por hectárea que cualquier planta oleaginosa (Peñarranda et al., 2013). En teoría hectáreas de algas pueden producir hasta 100.000 galones de biocombustible por año (Bošnjaković, 2013).
- El contenido oleaginoso y el perfil de composición lipídica de las microalgas, puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes (Garibay, Vázquez-Duhalt, Sánchez, Serrano, & Martínez, 2009).

2.3.4 Producción de Biocombustibles de Microalgas

La biomasa de microalgas contiene tres componentes principales: proteínas, carbohidratos y lípidos (aceite) (Dragone et al., 2010). Los lípidos pueden ser definidos como cualquier molécula biológica que es soluble en un solvente orgánico. La mayoría de los lípidos contienen ácidos grasos y generalmente pueden clasificarse en dos categorías en base a su polaridad: (1) lípidos neutros que comprenden acilgliceroles y ácidos grasos libres (FFA) y (2) lípidos

polares que pueden sub-clasificarse en fosfolípidos (PL) y glicolípidos (GL) (Halim et al., 2012).

El proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas está conformado en términos generales por las siguientes etapas indicadas en la Figura 3 (Garibay et al., 2009). *Cultivo de Biomasa*, el agua, los nutrientes, el CO₂ y la luz, son proporcionados a los sistemas de cultivos (abiertos, cerrados o híbridos). El CO₂ suministrado puede provenir del aire del ambiente, o bien, los sistemas de cultivo pueden ser acoplados a flujos ricos con este gas procedente de emisiones industriales, tales como las de las plantas generadoras de energía eléctrica. *La Cosecha*, la biomasa producida es separada del agua y los nutrientes residuales son recirculados hacia la etapa inicial de producción de biomasa. *El Secado*, y *la Extracción de lípidos*, seguido por la *Conversión de lípidos extraídos a biodiesel y glicerol* mediante la *Transesterificación*, y, finalmente, la *purificación del biodiesel producido* (Garibay et al., 2009; Taher et al., 2014).

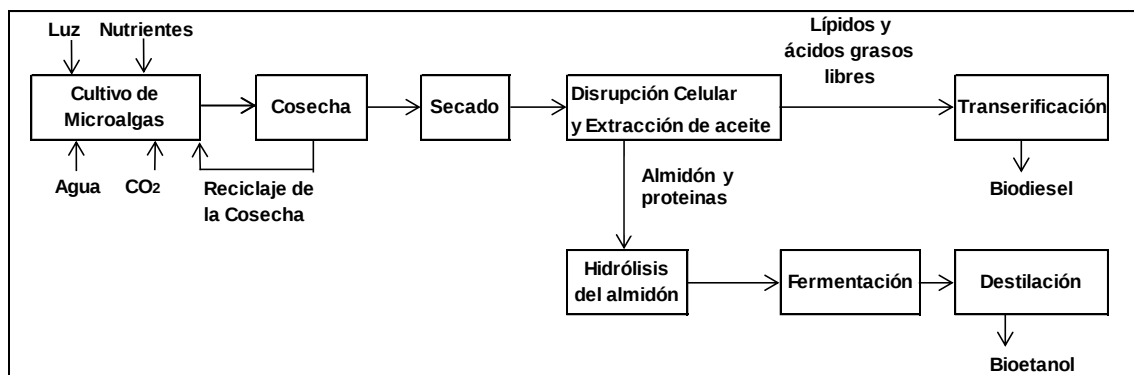


Figura 3. Proceso integrado de producción de biodiesel y bioetanol a partir de microalgas (Garibay et al., 2009).

El esquema conceptual mostrado en la Figura 3 puede incluir etapas adicionales que posibiliten acoplar la producción de biodiesel al aprovechamiento de los co-productos, es decir, el glicerol y la biomasa residual microalgal libre de lípidos, ya sea directamente como insumos industriales, en la alimentación humana, animal y/o acuícola; o indirectamente a través de su

transformación en productos alternos tales como biogás o bioetanol (Garibay et al., 2009).

A fin de que el biodiesel de microalgas sea sostenible con el medio ambiente, el total de CO_2 emitido en las etapas de procesamiento aguas abajo debe ser inferior o al menos igual al total de CO_2 capturado originalmente por las células de microalgas durante su cultivo. Por lo tanto, los procesos seleccionados en cada paso deben apuntar a reducir al mínimo el consumo de energía (Halim et al., 2012).

2.3.4.1 Tecnologías para el cultivo de microalgas

Las algas pueden cultivarse de dos maneras: de forma abierta o sistemas cerrados. Los cultivos abiertos comprenden sistemas naturales (lagos, lagunas, estanques), artificiales, de superficie inclinada y estanques tipo circuito ('Raceway ponds') (Figura 4-a). Fotobioreactores son usados como sistemas de cultivo cerrado (Figura 4-b) (Garibay et al., 2009; Halim et al., 2012).

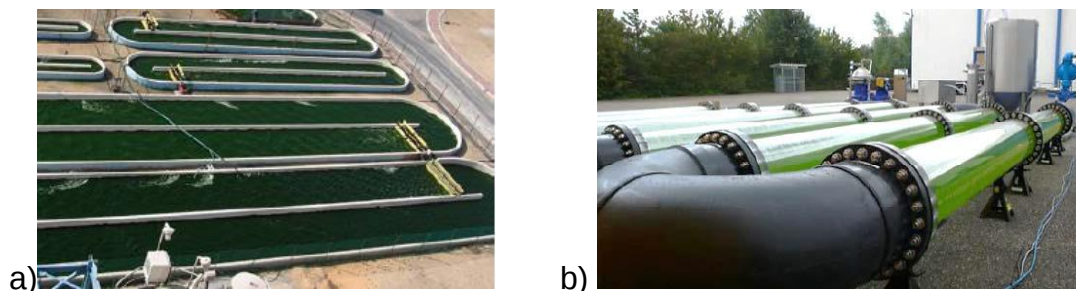


Figura 4. Sistemas para producción de microalgas. (a) Sistema tipo 'circuito': tipo de sistema con paletas giratorias para la circulación del agua. (b) Fotobioreactor tubular (Bošnjaković, 2013)

En un sistema abierto, las microalgas crecen en el entorno en donde los parámetros de cultivo (temperatura y la intensidad de la luz) dependen de las condiciones meteorológicas. Las microalgas cultivadas en un sistema de este tipo a menudo sufren de tasas de crecimiento inconsistentes y son más susceptibles a la invasión de especies locales. Por otro lado, las microalgas cultivadas en sistemas cerrados pueden tener condiciones de cultivo

controladas. A pesar de proporcionar una mejor protección contra la invasión de especies locales, los sistemas cerrados no son preferidos debido a su alto costo de operación (Halim et al., 2012).

2.3.4.2 Tecnologías para la cosecha de microalgas

Existen diferentes métodos de cosecha utilizados para eliminar el agua del cultivo de microalgas: centrifugación; filtración; sedimentación; floculación y flotación (Bošnjaković, 2013; Halim et al., 2012; Taher et al., 2014). Estos métodos han demostrado ser eficaces, pero costosos, representando 20-35% del costo total de la producción de biomasa (Taher et al., 2014).

La **floculación** se puede utilizar como una etapa de deshidratación inicial en el proceso de recolección que mejorará significativamente la facilidad del procesamiento adicional (Dragone et al., 2010). Durante la floculación, las células de microalgas se adhieren entre sí para formar agregados pesados que luego se sedimentan y son concentrados (Halim et al., 2012). Hierro, sales de aluminio y polímeros son típicamente utilizados para flocular las células de microalgas sin afectar a la composición y la toxicidad del producto (Dragone et al., 2010). Los métodos de **flotación** están basados en la captura de las células de algas usando micro burbujas de aire dispersas, por lo tanto, al contrario de la floculación, no requiere adición de químicos. Algunas cepas flotan naturalmente hacia la superficie del agua mientras el contenido de lípido algal incrementa. Aunque la flotación ha sido mencionada como un método potencial de cosecha, existe una evidencia muy limitada de la viabilidad técnica o económica (Brennan & Owende, 2010). Aparatos de **Centrifugación**, funcionan con el principio de sedimentación, donde la aceleración centrípeta se utiliza para la distribución uniforme de sustancias con densidad más alta y más baja. Aunque depende de las especies de algas y el tipo de máquina que se utiliza, el método es bastante rápido, eficaz y confiable, pero al rotar puede dañar las células sensibles de las algas. La tecnología de cosecha de



microalgas por centrifugación es muy cara. Por lo tanto, es rentable sólo para la producción a gran escala de algas en sistemas abiertos (Bošnjaković, 2013). **Filtración**, un medio que consiste de microalgas y agua, es filtrado a través de una membrana permeable con fuerza al vacío colectando la biomasa. La filtración es muy eficiente a bajas densidades de microalgas, pero es costoso y consume mucho tiempo (Bošnjaković, 2013).

2.3.4.3 Proceso de Secado

Por otra parte, se requiere usualmente una etapa de secado antes de la extracción de lípidos de las células de las microalgas cosechadas. Secado al sol es el método comúnmente más usado, ya que utiliza directamente la energía solar. Sin embargo, es un proceso que consume tiempo y la velocidad de secado, sigue siendo el desafío principal de dicho proceso. Otros procesos más rápidos son intensivos en energía y/o pueden alterar la estructura de los lípidos y la proteína rica de la biomasa sobrante, afectando su calidad. El paso del secado, se considera como el principal obstáculo de la producción de biodiesel a base de algas. Por lo tanto, la energía neta positiva del biodiesel de microalgas se podría obtener si se realiza la extracción en húmedo. Sería económicamente favorable para evitar la etapa de secado (Taher et al., 2014), pero disminuyendo también la eficiencia de la extracción (González., Kafarov., & Monsalve., 2009).

2.3.4.4 Proceso de Pretratamiento

Los microorganismos algares poseen una pared celular externa semipermeable, resistente y rígida, que rodea la membrana protoplasmática y el citoplasma. Con el fin de extraer los lípidos del interior de la célula, es necesario romper la pared celular y la membrana protoplasmática. Los procesos de extracción están íntimamente relacionados con la disrupción celular ya que es utilizada para mejorar la liberación de los lípidos de las algas y mejorar el acceso del solvente en la extracción de los ácidos grasos (Galindo



& Gonzáles, 2010).

Entre los métodos que han sido usados para tal fin se encuentran métodos físicos y químicos, como ultrasonido, microondas, molino de bolas, autoclave, homogenizadores de alta presión, enzimas, lisis ácida, lisis alcalina, y choque osmótico (Amaya & Sarmiento, 2010; Florentino de Souza Silva et al., 2014). El tipo de microorganismo, condiciones de cultivo, estructura, composición, y acondicionamiento previo de la célula afectan en la disrupción celular (Galindo & Gonzáles, 2010).

2.3.4.5 Extracción de lípidos

Con el fin de producir biodiesel a partir de la biomasa celular algal, los lípidos deben ser extraídos de la célula y recolectarse. Esto requiere la interrupción o ruptura de la célula algal y se puede lograr usando una variedad de métodos incluyendo rotura mecánica y química, extracción con solvente, extracción con fluidos supercríticos, y combinaciones y/o variaciones de estas técnicas (Sathish, 2012). Varios métodos de extracción pueden ser utilizados para extraer el lípido a partir de biomasa seca de microalgas. Las técnicas comúnmente más usadas son Folch, Bligh y Dyer, y Soxhlet. (Taher et al., 2014). Existen varios estudios de la etapa de extracción del aceite de las microalgas para su posterior transformación a biodiesel debido a la importancia de esta etapa en la eficiencia y los costos globales del proceso (González. et al., 2009).

2.3.4.6 Transesterificación de Lípidos

Como se mencionó con anterioridad en la sección 2.2.2.1, la transesterificación es la reacción entre triglicéridos y un alcohol especialmente el metanol para producir alquil-ésteres de ácidos grasos (biodiesel) y glicerol como subproducto, previo tratamiento con hidróxido de sodio. Cuando el metanol se utiliza, la reacción produce el éster metílico de ácido graso (FAME) o biodiesel



(Halim et al., 2012).

En experimentos a escala de laboratorio, donde sólo pequeñas cantidades de lípidos de microalgas crudo están disponibles, una gran cantidad de metanol es a menudo añadido para asegurar transesterificación cuantitativa. Una vez completada la transesterificación, la mezcla de la reacción, que contiene el biodiesel, y los subproductos contaminantes (glicerol, catalizador alcalino, y el exceso de metanol); a continuación, se somete a la purificación post-transesterificación para eliminar los subproductos. Los análisis de la composición FAME del biodiesel purificado de los lípidos se lleva a cabo utilizando un cromatógrafo de gases (Halim et al., 2012).

2.3.5 Métodos de Extracción de aceite

Extracción de lípidos con solventes. Técnicas de extracción con solvente son ampliamente usadas y eficaces para la extracción de lípidos a partir de microalgas (Russin et al., 2010). Esto es debido a la alta solubilidad de los lípidos en solventes no polares tales como cloroformo, hexano y éter de petróleo. Existen diferentes protocolos de extracción estándar tal como la extracción Folch, Bligh y Dyer, y el Soxhlet o técnicas de Gold-Fisch. Aunque el uso de solventes para extraer lípidos de algas es bastante sencillo, hay inconvenientes cuando se aplica a las microalgas. La extracción requiere que el agua se elimine de la biomasa antes de la extracción de lípidos para tener resultados óptimos. Si la biomasa no se seca hasta un cierto punto, el agua tiende a interferir en el proceso de extracción protegiendo los lípidos de la extracción con el solvente.

El método de Bligh & Dyer. Consiste en la homogenización a alta velocidad de la biomasa con una mezcla metanol-cloroformo en una proporción de 2 a 1. Luego de esto se realiza una filtración y una centrifugación, después de la cual quedan separadas las fases de metanol y cloroformo. Luego, se realiza una evaporación del cloroformo y se obtiene el aceite extraído. Este método ha



obtenido muy buenos resultados en la extracción de aceite de microalgas y se utiliza con frecuencia como complemento de métodos de destrucción mecánica o de autoclavado, aunque posee la desventaja de ser poco amigable con el ambiente debido a la toxicidad de los solventes utilizados.

Extracción asistida por microondas. La extracción asistida por microondas aprovecha la polaridad de las moléculas que componen la estructura de la microalga como los lípidos y las proteínas para crear fricción y por consiguiente calor, lo cual hace que el agua contenida en la célula escape debilitando la pared celular.

Extracción mediante ultrasonido. Consiste en la exposición de las microalgas a ondas acústicas de una frecuencia determinada, la utilización de ondas acústicas para la destrucción de la pared celular de las microalgas fue estudiada entre otros por Faerman et al., quienes demostraron experimentalmente que la aplicación de ultrasonido a baja frecuencia, causa una fuerte destrucción celular, incluso mayor que cuando se aplican ondas de alta frecuencia (González. et al., 2009).

Extracción mediante fluidos supercríticos. Estos métodos surgieron como una alternativa al empleo tradicional de grandes cantidades de solventes tóxicos para realizar extracciones. De este tipo de procesos, los más prometedores son la extracción con fluidos supercríticos (SFE), y la extracción con agua subcritica (SWE). Estas técnicas se caracterizan por poseer cortos tiempos de extracción y altas selectividades. El CO₂ es el solvente más utilizado como fluido supercrítico debido a la facilidad para su eliminación después de la extracción, baja toxicidad y costo, aunque posee la desventaja de tener una baja polaridad, por lo que su eficiencia baja a la hora de extraer componentes polares (González. et al., 2009).

Autoclavado. El autoclave originalmente es un aparato que se utiliza para

esterilizar instrumentos médicos u otros objetos por medio de presión y agua a altas temperaturas. Una ventaja de esta técnica para ser utilizada en la extracción de aceite de microalgas, es que se puede trabajar con la biomasa húmeda, lo cual evade la etapa de secado de la biomasa de microalgas, durante la cual se pueden degradar los lípidos presentes en las algas y aumenta los costos globales de proceso (González. et al., 2009).

Método de Extracción Soxhlet. El método Soxhlet es un método convencional utilizado para extraer productos naturales de materias orgánicas (Araujo et al., 2013). El sistema de extracción Soxhlet ha sido ampliamente utilizado en la extracción de aceite de microalgas. Este sistema, se compone de un *balón* donde se encuentra un solvente orgánico que es calentado hasta su ebullición; *un tubo de extracción Soxhlet*, donde es colocada la muestra, la cual va contenida en un cartucho de celulosa. También contiene un *condensador*, después de evaporarse, el solvente orgánico es condensado y cae al tubo Soxhlet, en el cual el solvente extrae el aceite contenido en la biomasa hasta que el tubo se llena.

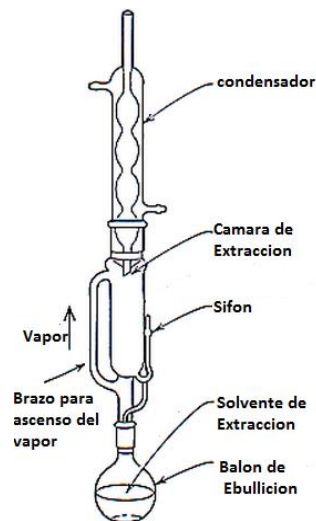


Figura 5. Equipo Soxhlet

Cuando el tubo está lleno de solvente, este es sifonado hasta el balón que contiene el resto de solvente y se repite el proceso (Figura 5).



Una gran cantidad de solventes se han utilizado como solventes de extracción en el método Soxhlet, el uso de un solvente no polar será selectivo al extraer lípidos no polares de las microalgas como los triglicéridos, los cuales son lípidos ideales para la producción de biodiesel (González. et al., 2009).

El solvente hexano ha sido evaluado como solvente de extracción para microalgas en el sistema Soxhlet con resultados interesantes, el hexano es relativamente económico, fácil de recuperar después de la extracción y posee selectividad hacia los lípidos neutros (González. et al., 2009). El método de extracción Soxhlet fue elegido por Ramluckan et al., debido a su simplicidad de operación, seguridad relativa y la posibilidad de escalado a nivel de planta industrial.

2.3.6 Factores de productividad y de producción de biocombustibles de microalgas

El contenido de lípidos de microalgas varía considerablemente de una especie a otra y podrían variar, en términos de biomasa del peso en seco, entre 5 y 77% (Tabla 2) (Brennan & Owende, 2010). Es posible aumentar la concentración mediante determinados factores de crecimiento (Brennan & Owende, 2010), tales como: el nivel de nitrógeno, intensidad de la luz, (Weldy & Huesemann, 2007), temperatura, la salinidad (Quin, 2005), la concentración de CO₂ (Morais & Costa, 2007), el procedimiento de cosecha (Chisti, 2008), la relación de ciclo luz / oscuridad, y la tasa de aireación (Halim et al., 2012).

Tabla 2. Contenido de Aceites de algunas Microalgas (Chisti, 2007)

Cultivo	Especie de microalga	Contenido lipídico (% peso seco)	Productividad lipídica (mg/l día)
Agua Dulce	Botryococcus sp.	25,0 - 75,0	-
	Chlorella emersonii	25,0 - 63,0	10,3 - 50,0
	Chlorella vulgaris	5,0 - 58,0	11,2 - 40,0
	Chlorella sp.	10,0 - 48,0	42,1
	Chlorococcum sp.	19,3	53,7
	Scenedesmus obliquus	11,0 - 55,0	-
	Scenedesmus quadricauda	1,9 - 18,4	35,1
	Scenedesmus sp.	19,6 - 21,1	40,8 - 53,9
Agua Marina	Dunaliella salina	6,0 - 25,0	116
	Dunaliella sp.	17,5 - 67,0	33,5
	Nannochloris sp.	20,0 - 56,0	60,9 - 76,5
	Nannochloropsis oculata	22,7 - 29,7	84,0 - 142,0
	Nannochloropsis sp.	12,0 - 53,0	60,9 - 76,5
	Neochloris oleoabundans	29,0 - 65,0	90,0 - 134,0
	Pavlova salina	30,9	49,4
	Spirulina platensis	4,0 - 16,6	-

Con respecto a la Fase de Crecimiento, al comparar los lípidos obtenidos en la fase logarítmica y estacionaria, lípidos de la fase estacionaria, a pesar de tener una gran cantidad de lípidos polares (51-57%) en peso, contienen altos niveles de triglicéridos (20-41% del total de lípidos) siendo más atractivo para el procesamiento de biodiesel que los lípidos obtenidos en la fase logarítmica. Es decir, células de microalgas cosechadas durante la fase estacionaria tienen un contenido de lípidos polares más altos que el obtenido durante la fase logarítmica en una misma especie (Halim et al., 2012).

Mediante la privación de oxígeno algunas especies de microalgas han aumentado su contenido de lípidos de 10% a casi el 20%. Células de microalgas generalmente responden a condiciones de escases de nutrientes mediante la intensificación de la vía metabólica que sintetiza lípidos neutros. Lípidos Neutros (Acilglicerol) son deseables para la producción de biodiesel a escala comercial por dos razones principales, debido a que, a escala



industrial la transesterificación está diseñada para procesar acilgliceroles y estos generalmente tienen un menor grado de insaturación que otras fracciones de lípidos (lípidos polares) (Halim et al., 2012). Para una producción económica de biodiesel a partir de microalgas, la alta productividad de la biomasa y el contenido de lípidos son importantes. Estos dos factores son difíciles de lograr de forma simultánea, ya que las condiciones para favorecer una alta productividad de biomasa suele dar lugar a una baja acumulación de lípidos, y viceversa (Taher et al., 2014).

2.4 Sistemas Lagunares

2.4.1 Generalidades

Los métodos actuales de cultivo de microalgas para producción de biocombustibles resultan costosos (Jonker & Faaij, 2013), por lo que una alternativa económica y ambientalmente viable sería aprovechar los efluentes de sistemas lagunares tales como lagunas de estabilización (WSP) y lagunas de algas de alta tasa (HRAP), que contienen altas concentraciones de estos microorganismos (Durazno, 2009), con una notable reducción de la huella de carbono global generada por el sistema de tratamiento. Una gran ventaja de las HRAP's comparadas con las WSP's es la recuperación del recurso de la biomasa algal, para usarse como fertilizante, alimento rico en proteínas o biocombustible, y agua como efluente tratado a un estándar alto. Aunque el uso solo de HRAP's para la producción de biocombustibles no es económico, el acoplamiento del tratamiento de las aguas residuales con la producción de biocombustibles se considera financieramente viable (Sutherland, Turnbull, & Craggs, 2014).

No hay un sistema estándar y único de lagunas para el tratamiento de aguas residuales. Hay varios tipos de lagunas que se clasifican de acuerdo a los flujos hidráulicos, los procesos dominantes bioquímicos, la eliminación de nutrientes y patógenos, etc. El uso combinado de diferentes lagunas da como resultado



un "sistema" con diferentes requerimientos de tierra, mano de obra operativa y energética. El término Lagunas de Estabilización de Residuos (WSP) cubre varias variantes de la tecnología de lagunas de tratamiento de aguas residuales. El más conocido y ampliamente utilizado es el sistema secuencial compuesto por lagunas anaerobias, facultativas y de maduración. Sin embargo, hay otras variantes importantes en la tecnología de tratamiento de lagunas como las lagunas de algas de alta tasa y las lagunas aireadas (A. Alvarado, 2013).

En los sistemas lagunares para el tratamiento de aguas residuales, la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), sólidos suspendidos, nutrientes, coliformes, bacterias, y la toxicidad son el objetivo principal de conseguir aguas residuales purificadas (Abdel-Raouf, Al-Homaidan, & Ibraheem, 2012).

2.4.2 Lagunas de Estabilización (WSP)

El "pasado" de las lagunas de estabilización pertenece principalmente a la experiencia temprana y a los códigos de diseño (como los "Ten States Standards") en Estados Unidos y a dos profesores de ingeniería en particular: Oswald en EE.UU. y de Marais, en el sur de África. El trabajo de estos dos pioneros de investigación de WSP es el fundamento básico de las actuales WSP (Mara, 2009).

Las lagunas de estabilización (WSP) son una serie de lagunas grandes y poco profundas que tratan aguas residuales crudas a través de procesos naturales relacionados con las bacterias y algas. El tratamiento lagunar es una de las técnicas de tratamiento más comunes para las aguas residuales en el mundo. Las WSP son usadas para tratar una variedad de aguas residuales, que proceden desde el hogar a la industria. Estas funcionan en una amplia gama de condiciones climáticas y se pueden utilizar para pequeñas comunidades rurales, así como para grandes poblaciones. También son conocidas por su tratamiento económico de las aguas residuales en los lugares donde grandes

extensiones de tierra estén disponibles (Andrés Alvarado, Vedantam, Goethals, & Nopens, 2012). La ventaja más importante de este tipo de tratamiento es la simplicidad en la construcción y operación. Se requiere un mínimo de supervisión para la operación diaria, para la limpieza de las obras de entrada y salida. Además, el sistema tiene una alta fiabilidad, ya que depende de procesos naturales y no hay necesidad de un equipo que puede fallar (Sperling, 2007a).

La Tabla 3 describe brevemente las ventajas y desventajas de las lagunas de estabilización de residuos (WSP).

Tabla 3. Ventajas y desventajas de WSP

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Simplicidad , son de fácil construcción: el movimiento de tierras es la actividad principal; otras obras civiles son esencialmente mínimas, como la construcción del terraplén de la laguna y la protección y, de ser necesario, un revestimiento de la laguna.	Liberación de olor , todas las plantas de tratamiento de aguas residuales sobrecargadas tienen problemas de olor, WSP no son una excepción; pero sí son adecuadamente diseñados, operados y mantenidos no tienen este problema.
Bajo costo , si se compara este tipo de sistema con otras opciones de tratamiento de aguas residuales, el WSP casi siempre cuesta menos, tanto para el costo de inversión inicial y los costos de operación y mantenimiento.	Suelo , este sistema requiere mucha más tierra que los procesos de tratamiento convencionales, tales como zanjas de oxidación o de lodos activados.
Alta Eficiencia , son extremadamente eficientes. Pueden ser fácilmente diseñados para lograr una remoción de DBO y sólidos suspendidos > 90%, así mismo de la absorción de amonio.	Calidad del efluente , Debido a la presencia de algas en la laguna los efluentes de WSP pueden ser altos en DBO y sólidos suspendidos (SS).

2.4.2.1. Configuración típica de las lagunas de estabilización

Un sistema WSP por lo general consiste en una combinación de lagunas facultativas y de maduración. Lagunas anaerobias o aireadas también se pueden añadir al sistema para efectos de pre tratamiento de aguas residuales de alta resistencia (Janssens, 2010). La Figura 6 muestra una configuración

típica de las lagunas de estabilización (WSP).

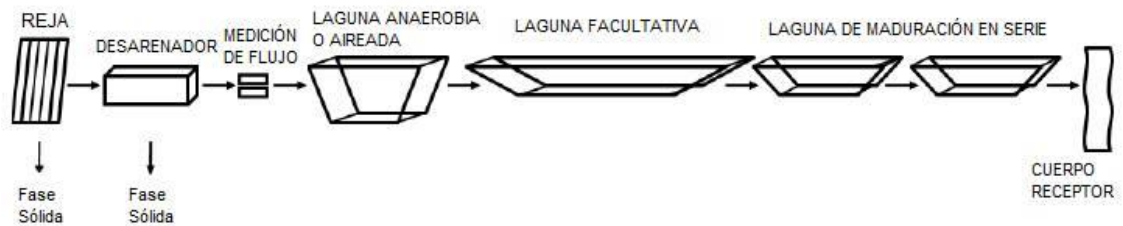


Figura 6. Configuración Típica de una Laguna de Estabilización (WSP) (Janssens, 2010).

Las **lagunas anaerobias** son por lo general el primer tipo de laguna que se utiliza en una serie de lagunas de estabilización. Tienen una profundidad de 2 a 5 m y reciben una carga orgánica alta (normalmente $> 100 \text{ g DBO} / \text{m}^3 \text{ día}$) que no contienen oxígeno disuelto ni algas, aunque de vez en cuando una película delgada de *Chlamydomonas* puede estar presente en la superficie. Funcionan como tanques sépticos abiertos, y su función principal es la remoción de DBO (Mara, 2004).

Las **lagunas facultativas** son las más comunes en el tratamiento de lagunas. El término facultativo se refiere al hecho de que estas lagunas consisten en 3 zonas: una zona anaerobia, aerobia, y facultativa. La *zona anaerobia* de estas lagunas tiene características similares a las lagunas anaerobias. La capa superior o *zona aerobia* se oxigena debido a la presencia de una alta concentración de algas, que producen oxígeno a través de la fotosíntesis. Este último depende de la disponibilidad de energía solar. Sin embargo, al aumentar la profundidad, disminuye la penetración de la luz, haciendo que el consumo de oxígeno sea mayor que su producción, con una ausencia ocasional de oxígeno a partir de una cierta profundidad. Por otra parte, la fotosíntesis no se produce durante la noche y la ausencia de oxígeno puede prevalecer. La *zona facultativa* es donde la presencia o ausencia de oxígeno puede ocurrir, donde prevalecen las bacterias que pueden sobrevivir en estas dos condiciones.



Cuando hay ausencia de oxígeno las bacterias utilizan nitrato como receptor de electrones (Sperling, 2007a).

A continuación de las lagunas facultativas, están las **lagunas de maduración** que sirven como un tratamiento terciario, debido a que reciben una baja carga orgánica y de nutrientes. Estas están por lo general bien oxigenadas y su función principal es eliminar los agentes patógenos, también puede lograr una cantidad significativa de eliminación de nutrientes (Janssens, 2010).

2.4.2.2 Microalgas presentes en lagunas de estabilización

En la zona aerobia, la fotosíntesis se lleva a cabo por una amplia variedad de microalgas. Su concentración es por lo general inferior a 200 mg/l (peso seco) y su número puede alcanzar entre 10^4 a 10^6 organismos por ml. La producción diaria de algas se encuentra en un rango entre 10 a 66 g/m². Concentraciones de clorofila “a” en lagunas facultativas suelen oscilar entre 500 a 2000 µg/l (A. Alvarado, 2013). En la Tabla 4 se muestra una revisión de las algas que con frecuencia se encuentran en las lagunas facultativas y de maduración.

Los principales tipos de algas presentes en WSP son las algas verdes (*Chlorophyta*) y las algas pigmentadas (*Euglenophyta*). Estas algas son responsables del color verde de la laguna. Los géneros más importantes de estos grupos son *Chlorella*, *Chlamydomonas* y *Euglena*, de los cuales estos dos últimos poseen flagelos. Una tercera división de algas presentes en el sistema son las *Cyanobacterias*, que poseen características de bacterias y algas y son en realidad clasificadas como bacterias. Estos organismos no tienen orgánulos locomotores, pero son capaces de moverse a través del sistema por deslizamiento. Las *Cyanobacterias* típicamente proliferan en condiciones de pH bajo y baja disponibilidad de nutrientes, lo que es un ambiente desfavorable para el crecimiento de las *Chlorophytas*. Las *Cyanobacterias* más importantes presentes en las WSP's son *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Anacystis* y *Anabaena*. Otros tipos de algas que se pueden

encontrar en las WSP's son *Bacillariophyta* y *Chrysophyta* (Sperling, 2007a).

Tabla 4. Especies de algas presentes en lagunas facultativas y de maduración (A. Alvarado, 2013)

Género algal	Lagunas Facultativas	Lagunas de Maduración
<i>Euglenophyta</i>		
Euglena	+	+
Phacus	+	+
<i>Chlorophyta</i>		
Chlamydomonas	+	+
Chlorogonium	+	+
Eudorina	+	+
Pandorina	+	+
Pyrobotrys	+	+
Ankistrodesmus	-	+
Chlorella	+	+
Micractinium	-	+
Scenedesmus	-	+
Selastrum	-	+
Carteria	+	+
Coelastrum	-	+
Dictosphaerium	-	+
Oocystis	-	+
Rhodomonas	-	+
Volvox	+	-
<i>Chrysophyta</i>		
Navicula	+	+
Cyclotella	-	+
<i>Cyanobacteria</i>		
Oscillatoria	+	+
Arthrospira	+	+
Spirulina	-	+

Las especies y géneros de algas dominantes en una laguna parecen depender de la carga orgánica en la superficie de la laguna. Ya que en la mayoría de los casos, cuando la carga orgánica en el sistema aumenta, la diversidad de la comunidad de algas disminuye. Los estudios sobre WSP's en el noreste de Brasil muestran que las lagunas con una carga orgánica de más de 30 kg



DBO/ha día, tienden a promover las especies de los géneros flagelados (e.g., *Euglena*, *Pyrobotrys* y *Chlamydomonas*) en la flora de algas. Con cargas más bajas, *Chlorella* y *Scenedesmus* son más abundantes y la comunidad de algas llega a ser más diversa. Esto se debe a que con el aumento de las condiciones turbias los organismos no flagelados con sus mecanismos de flotación relativamente ineficientes no pueden competir con la movilidad de las especies flageladas. Por lo tanto, las especies flageladas son capaces de ajustar su posición en la columna de agua en respuesta a las condiciones cambiantes de luz incidentes a diferencia de las especies no flageladas. Pearson et al. (1987) encontraron que si las especies no móviles fueron capaces de mantener su posición en un nivel favorable podrían competir con las especies móviles. Athayde et al. (2001) llegaron a la conclusión, en base a conteos celulares de algas en las WSP's que *Chlamydomonas* es de los géneros de algas más tolerante a la contaminación, mientras que *Scenedesmus* favorece a la baja carga de DBO. Estas características hacen de *Chlamydomonas* y *Scenedesmus* los mejores indicadores del impacto de los cambios en la carga orgánica (Janssens, 2010).

2.4.3 Lagunas de Algas de Alta Tasa (HRAP)

Las lagunas de algas de alta tasa forman parte de un sistema avanzado de lagunas ("Advanced Pond System" APS). El sistema APS consiste en una serie de cuatro tipos de lagunas: lagunas facultativas avanzadas (AFP), lagunas de algas de alta tasa (HRAP), lagunas de sedimentación de algas (ASP), y lagunas de maduración. La Figura 7 ilustra la configuración típica del sistema de lagunas avanzadas (APS).

El sistema de lagunas avanzadas APS, está especialmente diseñado para optimizar los procesos de tratamiento de aguas residuales y naturales, y también proporciona oportunidades para la recuperación de recursos a través de la captura de biogás para la producción de energía, la cosecha de la

biomasa de algas como fertilizante, y la reutilización de aguas residuales tratadas (Craggs, Sukias, Tanner, & Davies-Colley, 2004).

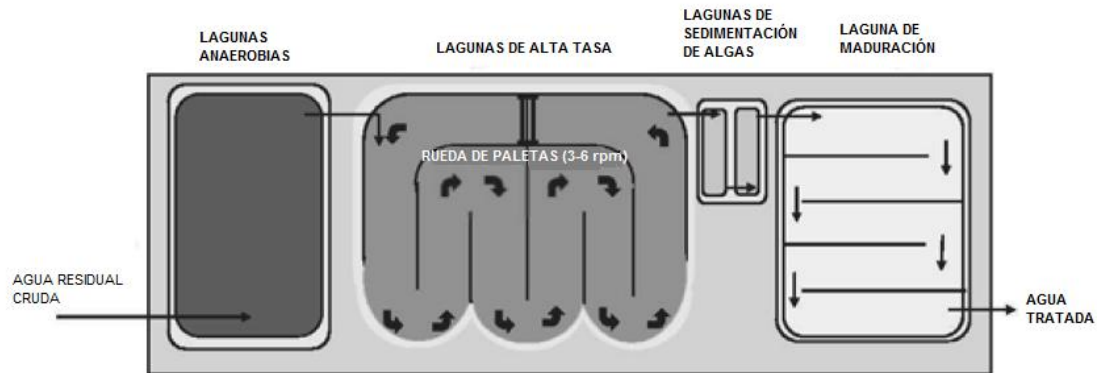


Figura 7. Configuración de un sistema avanzado de lagunas (APS) (Craggs et al., 2004)

Las primeras lagunas en el sistema son las lagunas anaerobias (AP) que promueven la sedimentación y el tratamiento anaerobio de los sólidos de aguas residuales.

El tratamiento de aguas residuales mediante lagunas de algas de alta tasa (HRAP) fue por primera vez propuesto en la década de 1960 por el profesor William Oswald en la Universidad de California en Berkeley. Fueron originalmente diseñadas para maximizar la producción de algas en un ambiente totalmente aerobio, en lugar de optimizar el tratamiento de aguas residuales, simplemente porque las algas son 50-60 % de proteína y el rendimiento de proteína de HRAP es mucho mayor que en la agricultura convencional (aproximadamente 30000 kg de proteína / Ha año, comparado con menos de 1000 kg / ha año de soya) (Mara, 2004).

Las HRAP están conformadas por canalizaciones (*raceway*) que pueden estar configuradas por uno o varios bucles alrededor de las paredes divisorias centrales que se mezclan continuamente por una rueda de paletas. La velocidad media del agua (15 cm/s) evita la estratificación térmica y mantiene las algas suspendidas uniformemente en la laguna, mientras los flóculos



bacterianos aerobios más grandes caen a lo largo del fondo de la laguna. El afluente de las HRAP se canaliza al fondo del estanque y es separado del efluente, que va hacia la superficie de la laguna, por una rueda de paletas. Por lo tanto, el afluente fluye alrededor y se mezcla en la laguna antes de llegar a la salida a fin de reducir una discontinuidad en el flujo.

Las HRAP's utilizan la energía solar para proporcionar oxigenación fotosintética para que se lleve a cabo la descomposición aerobia de la materia orgánica disuelta en el agua residual por las bacterias heterotróficas. Los nutrientes se eliminan mediante la asimilación en la biomasa algal y por volatilización del amoníaco y la precipitación de fósforo con pH alto, que se produce como resultado de la intensa fotosíntesis de las algas. Las tasas elevadas de desinfección son el resultado de la exposición a la radiación solar en presencia de alto contenido de oxígeno disuelto (OD) y a los niveles de pH en la laguna. Se ha demostrado que es eficiente en la eliminación de huevos de nematodos, *Cryptosporidium* y virus (Craggs et al., 2004).

La tercera laguna es la laguna de sedimentación de algas (ASP), que permite la recuperación de la biomasa algal. Esta laguna está diseñada para la sedimentación y eliminación de la biomasa algal, puede ser de hasta 3 m de profundidad en el extremo de entrada y se inclina hacia arriba a lo largo de su longitud a una profundidad de 0,5 a 1,0 m en el extremo de salida. Esta laguna restringe el crecimiento de las algas.

La cuarta laguna es la laguna de maduración (MP), está diseñada para el "pulido" del efluente mediante la presencia de zooplancton que consume las algas y desinfecta de forma natural mediante una combinación de radiación solar-UV y sedimentación. Estas lagunas también permiten la descarga controlada o el almacenamiento de riego del efluente. Las lagunas de maduración pueden tener una profundidad de 1-3 m y pueden ser diseñadas con suficiente tiempo de residencia para proporcionar un alto nivel de

desinfección. Estas también pueden ser diseñadas en serie (Craggs et al., 2004).

2.4.3.1 Microalgas presentes en lagunas de algas de alta tasa (HRAP)

En sistemas convencionales de lagunas de estabilización, el agua de la laguna facultativa fluye hacia la laguna de alta tasa, donde las bacterias aerobias descomponen la materia orgánica disuelta. El oxígeno se suministra fotosintéticamente por las microalgas. El crecimiento rápido de las microalgas también aumenta la alcalinidad del agua, eliminando a los agentes patógenos. Debido a que las microalgas sobresaturan la laguna de alta tasa con oxígeno, el agua de esta laguna recircula a la capa superior de la laguna facultativa para reforzar el contenido de oxígeno, reduciendo o eliminando la necesidad de aireación mecánica. Hay una serie de opciones prácticas que pueden mejorar la producción de biomasa en el tratamiento de aguas residuales (HRAP) tales como la adición de CO_2 y el reciclaje de una parte de las algas cosechadas. Debido a que la relación C:N de aguas residuales domésticas (3C:N) es inferior a la de las células de algas (6C:N), puede haber limitación de carbono en las HRAP's. Por lo tanto, la adición de CO_2 (por ejemplo, los gases de combustión) puede mejorar la producción de biomasa de algas mediante el aumento de la disponibilidad de carbono. Park y Craggs (2010 y 2011a) reportaron que la adición de CO_2 a una HRAP a escala piloto para el tratamiento de aguas residuales mejora la productividad de la biomasa doméstica en un 30% en verano. En algunos casos la producción de biomasa en HRAP's es subóptimo debido a ser operado con tiempos de retención hidráulica bajos (HRTs). En estos casos, el reciclaje de una parte de algas recolectadas de la laguna ('reciclado de algas'), aumentan la concentración de algas hasta el nivel óptimo que podría aumentar la producción de biomasa.

Las especies de algas que se encuentran comúnmente en HRAP's de tratamiento de aguas residuales (tales como *Scenedesmus* sp.,



Micractinium sp., *Actinastrum* sp., y *Pediastrum* sp.) pueden crecer como colonias grandes sedimentables (diámetro de colonia de 50 a 200 μm), y también forman grandes bio-flóculos (diámetro > 500 μm) asociado con bacterias. Por lo tanto, promover el predominio de esta colonia de algas podría mejorar la eficiencia de la cosecha de la biomasa del efluente de HRAP. Weissman y Benemann (1979) y Park et al. (2011b) propusieron que el reciclaje de algas podría ser una forma sencilla y práctica para promover el predominio de colonias de algas fácilmente-sedimentables. Park et al., realizaron un estudio en el que compararon dos lagunas de algas de alta tasa a escala piloto, una con algas recicladas (HRAP_r) y sin algas recicladas (HRAP_c) en Nueva Zelanda por un año. En ese año el estudio mostró la prevalencia (basada en biovolumen algal) de algas fácilmente sedimentables, *Pediastrum boryanum*, incrementando a más del 90 % en HRAP_r comparado con solo el 53% de prevalencia en HRAP_c. Sin embargo, se debe estudiar no solo la manera de mejorar tanto la productividad de biomasa y eficiencia de cosecha para mejorar la productividad de la biomasa cosechable porque depende también de la producción de biodiesel. Es necesario considerar el contenido energético de la biomasa algal para determinar el “rendimiento energético de la biomasa” actual (Park, Craggs, & Shilton, 2013).



CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La Universidad de Cuenca a través del proyecto VLIR inició experimentaciones con microalgas con fines farmacéuticos en la Facultad de Ciencias Químicas mediante el Proyecto “Plantas Medicinales”. Sin embargo, el aprovechamiento de la biomasa algal con fines energéticos fue propuesto a través del proyecto “Caracterización biocinética y potencial energético de microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual” financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC) y el apoyo del proyecto VLIR. Parte fundamental de este proyecto fue la implementación de reactores que fueron desarrollados mediante técnicas de cultivo, con la finalidad de desarrollar métodos eficientes que mejoren las condiciones de crecimiento y adaptación de los cultivos de microalgas a escala laboratorio (Cabrera & Pulla, 2014).

Como una breve introducción, la Figura 8 indica en forma secuencial la metodología usada para el cultivo de microalgas, cosecha de biomasa algal y extracción de lípidos. Se detallarán todos los métodos y experimentaciones realizadas en la investigación, incluyendo los materiales utilizados para cada uno.

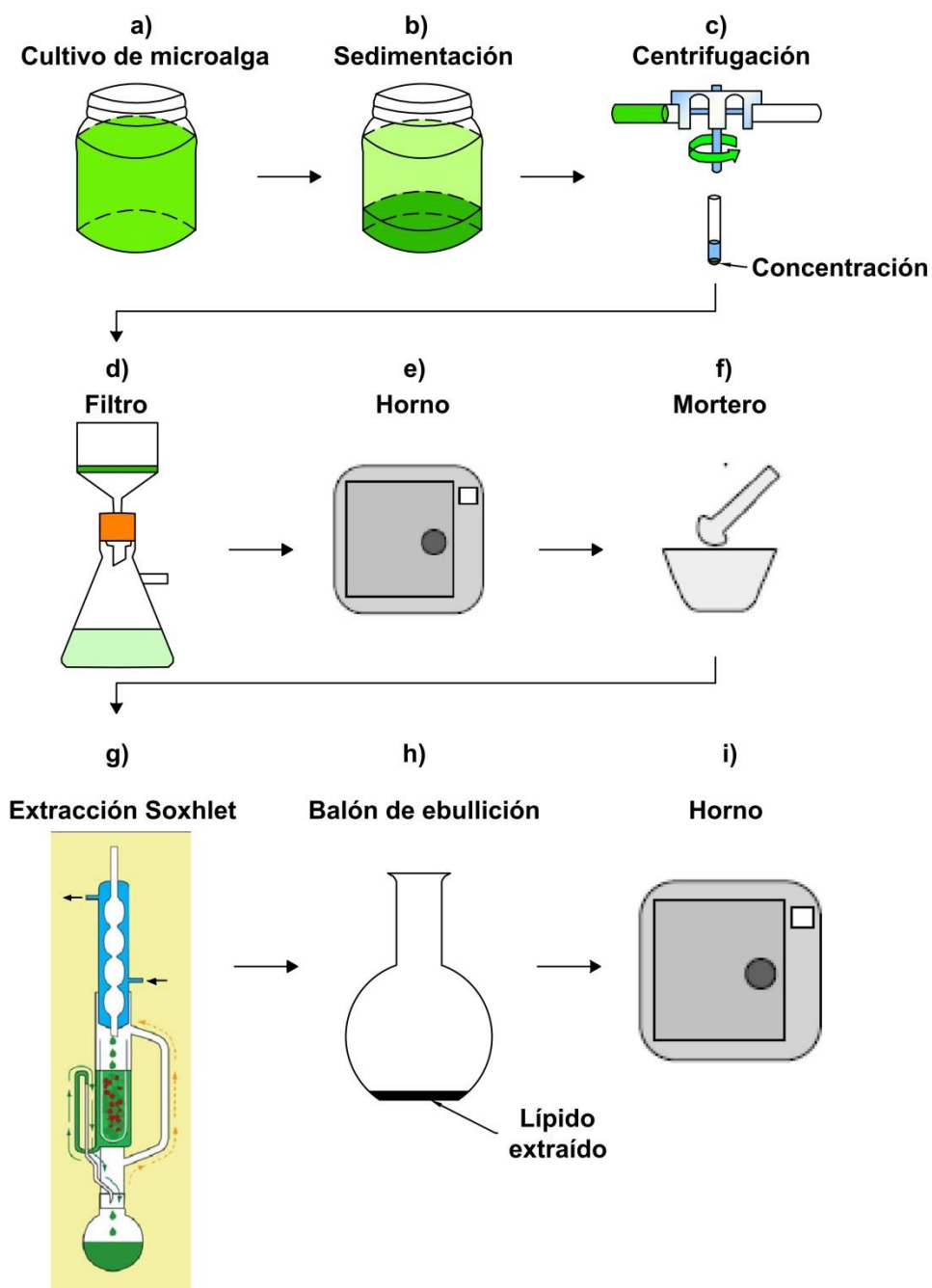


Figura 8. Etapas experimentales llevadas a cabo para la producción a escala de laboratorio de biodiesel de microalgas utilizando el método de extracción Soxhlet.

3.1 Familias de Algas estudiadas

Para la realización del proyecto fueron empleadas diferentes familias de microalgas provenientes del proyecto VLIR Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca, en donde se realizó un proceso de aislamiento de diferentes cepas de microalgas. Dos familias fueron identificadas *Chlorella* y *Scenedesmus*, procedentes de las lagunas de maduración de la PTAR ubicada en el sector Ucubamba de la ciudad de Cuenca. Tres familias de microalgas provenientes de diferentes embalses no pudieron ser identificadas pero de acuerdo al proyecto fueron clasificadas como cianobacterias; para que estas pudieran ser aisladas, en una tesis previa se asignó los siguientes nombres genéricos: *H1*, proveniente del Parque Nacional “El Cajas” y *FF.Especie 1* y *FF.Especie 3* provenientes del sector La Josefina, en el río Paute en la provincia del Azuay. En la Figura 9 se muestran las especies vistas en el microscopio.

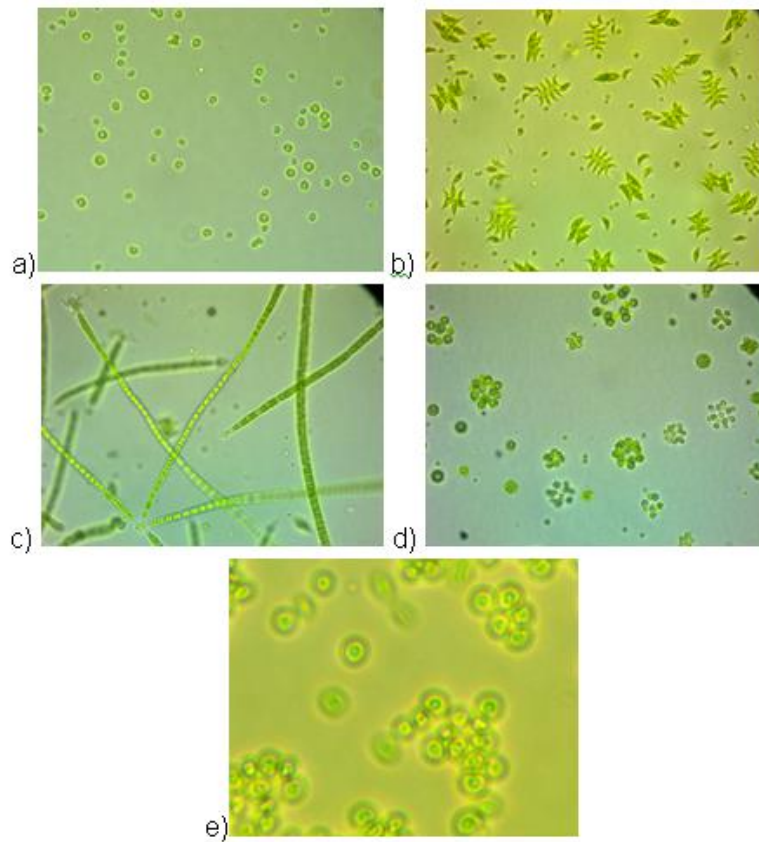


Figura 9. Especies de Microalgas. (a)Chlorella. (b)Scenedesmus. (c)F.F. Especie 1. (d)H1.

(e)F.F. Especie 3.

En la tesis previa de Línea base para el aprovechamiento de microalgas de Sistemas de Tratamiento de Agua Residual se caracterizó a estas familias de microalgas como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Caracterización de las Familias de Microalgas estudiadas.

Especie de Microalga	Características
<i>Chorella</i>	Se las puede apreciar de forma esférica, en donde se puede diferenciar un núcleo de color rojizo y una membrana claramente definida. Se adaptan rápidamente al medio de cultivo implementado, al mismo tiempo se multiplican rápidamente por lo que exhiben tasas de crecimiento muy altas en comparación con otras especies y familias.
<i>Scenedesmus</i>	Estas microalgas en su fase inicial son unicelulares, en forma de pequeñas esferas que al ir creciendo se transforman en colonias con forma de media luna y poseen en su interior pequeñas esferas que nuevamente se desarrollaran en forma unicelular para luego formar colonias. Estas microalgas además presentan fácil sedimentabilidad, son de fácil adaptabilidad al medio de cultivo y son predominantes ante las familias como la H1, FF. Especie 1 y FF. Especie 3.
<i>H1</i>	Crece en colonias en las que generalmente se diferencian cinco células encerradas por aparentemente una membrana, son de forma esférica con un mayor tamaño que la familia Chlorella, y no se diferencia claramente su núcleo. Esta familia se tarda más en adaptarse al medio de cultivo en comparación con las otras familias estudiadas, pero una vez adaptada crece rápidamente. Tienen además un alto contenido de humedad por lo que presenta baja sedimentabilidad.
<i>FF.Especie 1</i>	Está conformada por filamentos en los cuales se observan pequeñas divisiones transversales, están identificadas como cyanobacterias.
<i>FF.Especie3</i>	Tienen forma esférica, núcleo de color verdoso y la membrana bien definida, esta familia es de fácil adaptación al medio de cultivo y se reproducen rápidamente. También es identificada como cyanobacterias.

En la tesis mencionada se logró cultivar con éxito estas especies que fueron utilizadas en el proceso de experimentación. Una parte esencial del proceso de experimentación consiste en la extracción de lípidos de la biomasa cosechada. La extracción de lípidos se realizó principalmente con el ensayo Soxhlet; sin



embargo, se experimentaron algunas técnicas de densificación de biomasa y extracción en el laboratorio de sanitaria de la Facultad de Ingeniería.

3.2 Control de las condiciones que afectan el crecimiento en el cultivo de microalgas

Al considerar el empleo de microalgas para la producción de biodiesel, es importante definir cuantitativamente la influencia de factores que intervienen en su crecimiento y que favorecen la producción de lípidos, así como su interrelación para poder manipularlos en la obtención de biomasa con determinadas características como la concentración de nutrientes, la calidad y cantidad de luz, la temperatura, las concentraciones de O_2 , CO_2 , el pH, la salinidad y factores operacionales como mezclado y la edad del cultivo (Fernández et al., 2012).

3.2.1 Materiales utilizados para el control de las condiciones

3.2.1.1 Fotobioreactores

- Reactores cilíndricos de vidrio transparentes y lisos con diferentes volúmenes útiles de 3.5 y 1.5 litros (Figura 10-a).
- Sistema de agitación para la homogenización del cultivo, utilizando un agitador magnético modelo MS-17B, cuyo rango de velocidad es de 150-2500 rpm con un magneto de 25 mm de longitud y 5 mm de diámetro (Figura 10-b).
- Lámparas fluorescentes VOLTECH de 250 V-60Hz 250W 1 A, con la finalidad de proporcionar al cultivo la fuente de energía lumínica necesaria para el crecimiento (Figura 10-c).
- Compresor de aire modelo ACQ-003, 35 W de poder y dimensiones 183x97x116 mm (Figura 10-d), manguera de diámetro 1/4" y un difusor de aire que produce pequeñas burbujas que servirán de oxigenación para las microalgas (Figura 10-e).

- pH-metro YSI MultiLab IDS 4010-2 (Figura 10-f) incluido un sensor de pH.

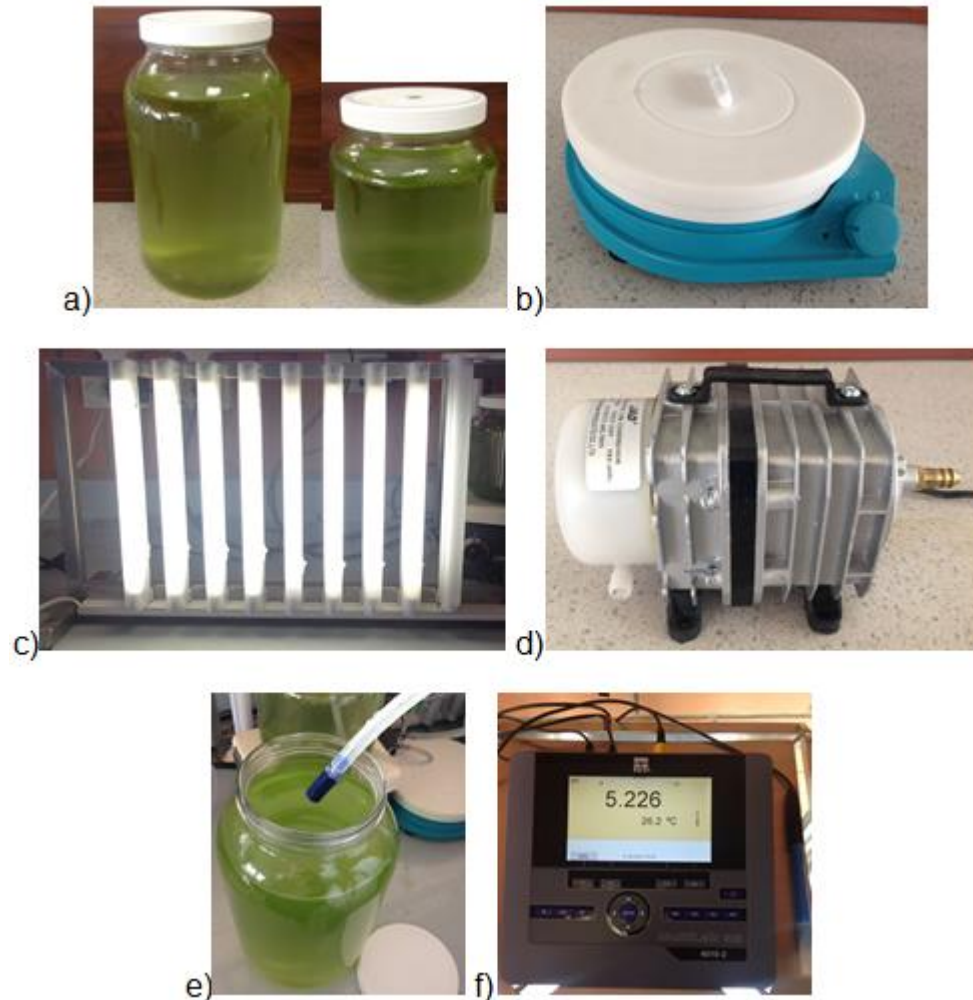


Figura 10. Materiales usados para el control de condiciones ambientales. (a) Reactor Cilíndrico de 3.5 y 1.5 litros. (b) Sistema de Agitación. (c) Sistema de iluminación fluorescente. (d) Compresor de aire. (e) Manguera y difusor de oxígeno. (f) pH metro YSI MultiLab IDS 4010-2.

3.2.1.2 Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado está comprendido por:

- Bicarbonato de Sodio NaHCO_3 (Figura 11-a) o Carbonato de Sodio Na_2CO_3 (Figura 11-b).
- Abono completo que sirve como fuente de nutrientes, este contiene: 12 % de Nitrógeno, 12 % Fósforo, 17 % de Potasio, 2 % de Magnesio y otros

micronutrientes (Figura 11-c).

- Agua destilada.
- Balanza de precisión de 0.0001g “Excellence Analytical Balances” modelo XS-204 de METTLER TOLEDO (Figura 11-d) para pesar las cantidades exactas de cada compuesto.
- Cápsulas de vidrio transparente, utilizadas para la colocación de las cantidades de compuestos del medio de cultivo (Figura 11-e).

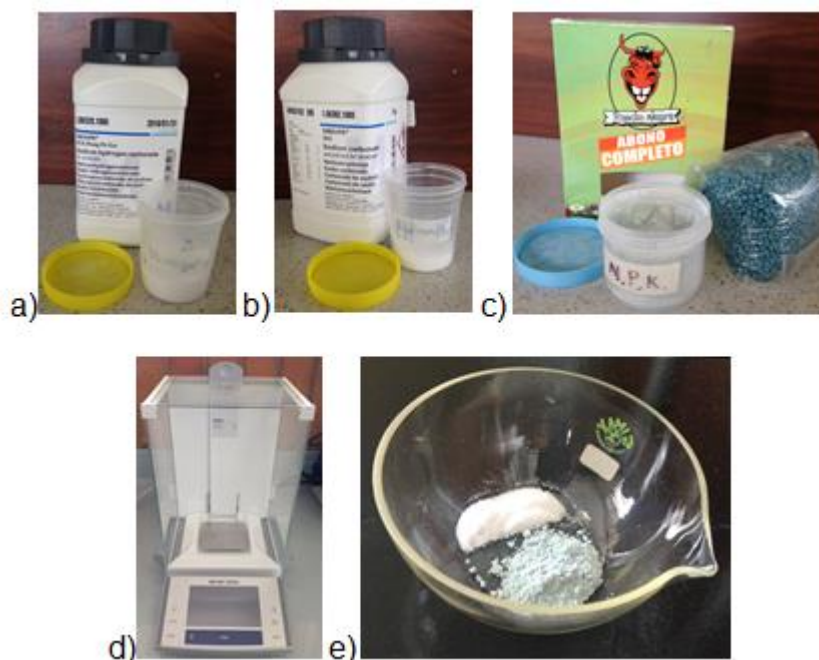


Figura 11. Componentes del medio de cultivo. (a) Bicarbonato de sodio. (b) Carbonato de Sodio. (c) Nutrientes. (d) Balanza de precisión de 0.0001 g. (e) Cápsula de vidrio.

3.2.2 Procedimiento para el cultivo de microalgas

- Inicialmente como inóculo se colocó la especie de microalga a ser cultivada en el reactor, aproximadamente un 20% de su volumen. En caso de ser el cultivo inicial, se completó el volumen del reactor con agua destilada; pero cuando se disponía de agua reciclada de cultivos anteriores se completó el volumen del reactor con esta solución, ya que esta es rica en nutrientes que pueden ser aprovechados (Cabrera & Pulla, 2014).
- Como siguiente paso se utilizó la balanza de precisión en donde se pesaron



las cantidades requeridas del medio de cultivo (carbonato o bicarbonato de sodio y nutrientes) en cápsulas de vidrio transparente.

3.2.3 Procedimiento para el control de las condiciones de cultivo

Luz: La energía lumínica que se proporcionó a todas las familias de microalgas fue de forma artificial, con ciclos alternados de una hora luz y una hora obscuridad, controlada mediante un relé. Este último fue controlado por el programa LabVIEW.

Agitación: Se controló que las algas no se sedimenten y no se adhieran a las paredes de los reactores mediante los agitadores magnéticos en el primer rango de velocidad que corresponde a una velocidad de 150 rpm. Una correcta agitación es capaz de someter a las algas a ciclos rápidos de mezclado, en los que en cuestión de milisegundos pasan de una zona oscura a una zona iluminada, es importante señalar sin embargo, que no todas las especies toleran una agitación fuerte, ya que son sensibles al estrés hidrodinámico (Ruiz, 2011).

Oxígeno: Se adicionó oxígeno al reactor, con un compresor tipo pecera en el cual se conectó la manguera de diámetro 1/4" y al final de esta el difusor de aire mencionado con anterioridad.

pH: El pH en la mayoría de cultivos de microalgas se encuentra entre 7 y 9, con un rango óptimo entre 8,2–8,7 (Ruiz, 2011). La medida de pH se monitoreó utilizando el pH-metro mencionado con anterioridad, para la familia de microalga *Chlorella*, en donde se realizó mediciones diarias manuales simples. Cuando los valores de pH sobrepasaban el rango óptimo, éste se controló mediante la adición de pulsos de CO₂. Si el pH del cultivo estaba por debajo del rango óptimo éste era regulado con la adición de bicarbonato (Figura 12).



Figura 12. Medida de pH.

3.3 Cosecha de Biomasa para la producción de biodiesel

La biomasa algal debe ser separada del medio de cultivo para su aprovechamiento. El tiempo óptimo para la cosecha es cuando el crecimiento de las microalgas ha llegado al final de la fase exponencial, debido a que en este tiempo la calidad de los lípidos para biocombustible que serán obtenidos en la extracción es superior, como se mencionó en la revisión bibliográfica, sección 2.3.6. Dicho crecimiento fue monitoreado en forma cualitativa a través de un parámetro indirecto que es la turbiedad, donde valores mayores de turbiedad en una muestra indican una mayor abundancia de biomasa.

Se utilizaron las técnicas de sedimentación, centrifugación y filtración. A continuación se detallan los materiales y procedimientos utilizados para cada técnica.

3.3.1 Medición de turbiedad

Se tomaron muestras del medio de cultivo de todas las familias de microalgas del bioreactor utilizando pipetas volumétricas de 25ml con la ayuda de una pera de succión (Figura 13-a) que facilita la extracción. Las muestras fueron colocadas en las cubetas que vienen incorporadas en el turbidímetro WTW modelo Turb 555 (Figura 13-b). Previo a la medición se verificó que las cubetas estén limpias y la muestra esté homogenizada. En la Figura 13-c se muestra la medición en el turbidímetro.

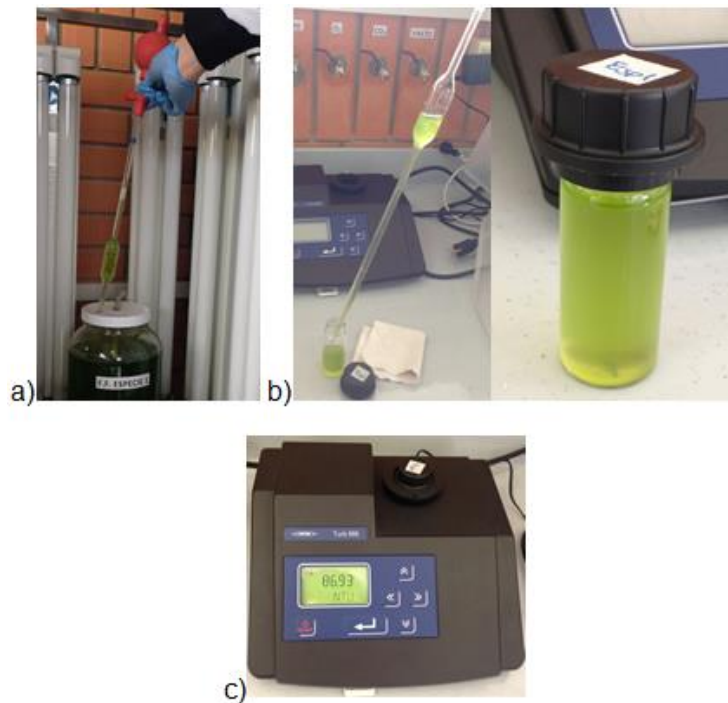


Figura 13. Procedimiento de medición de la turbiedad. (a) Toma de muestras. (b) Muestra en cubeta. (c) Medición de turbiedad.

3.3.2 Sedimentación

Se recolectó parte del cultivo en matraces de diferentes volúmenes según el requerimiento (Figura 14-a), aproximadamente el 80%, retirando del sistema de agitación y aireación de los bioreactores. Posteriormente estos matraces fueron refrigerados (Figura 14-b).

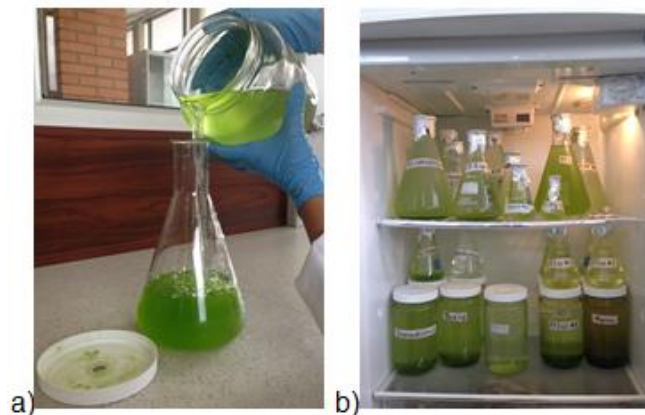


Figura 14. Sedimentación. (a) Separación del cultivo de los bioreactores. (b) Refrigeración de matraces para la sedimentación.

3.3.3 Centrifugación

La biomasa sedimentada en los matraces se colocó en tubos plásticos de 50 ml (Figura 15-a). Estas se colocaron en la Centrífuga Thermo Scientific Heraeus Megafuge 8, separando las fases sólida y líquida por la diferencia de densidades. La velocidad de rotación fue de 4000 rpm (Figura 15-b).

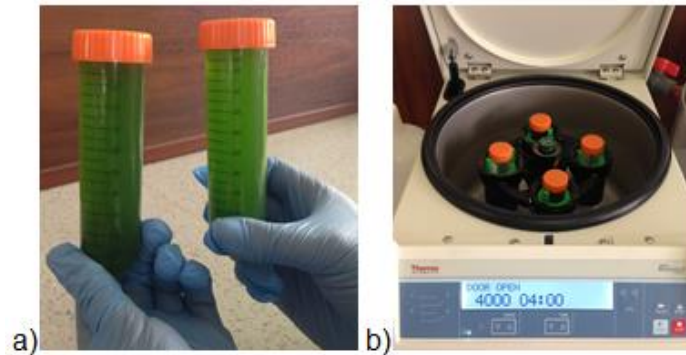


Figura 15. Centrifugación. (a) Tubo de plástico de 50 ml. (b) Separación de microalgas por centrifugación.

3.3.4 Filtración

Se llevó a cabo este proceso utilizando una bomba de succión, un filtro de porcelana (Figura 16-a) y un filtro de papel de Whatman de 110 mm de diámetro (Figura 16-b). La biomasa centrifugada en el proceso anterior se sometió al proceso de filtración, para ello se colocó el filtro de papel Whatman dentro del filtro de porcelana y se accionó la bomba para retirar el exceso de agua. La biomasa filtrada fue retirada cuidadosamente del filtro con la ayuda de una espátula (Figura 16-c), finalmente la biomasa se colocó en cajas petri (Figura 16-d).

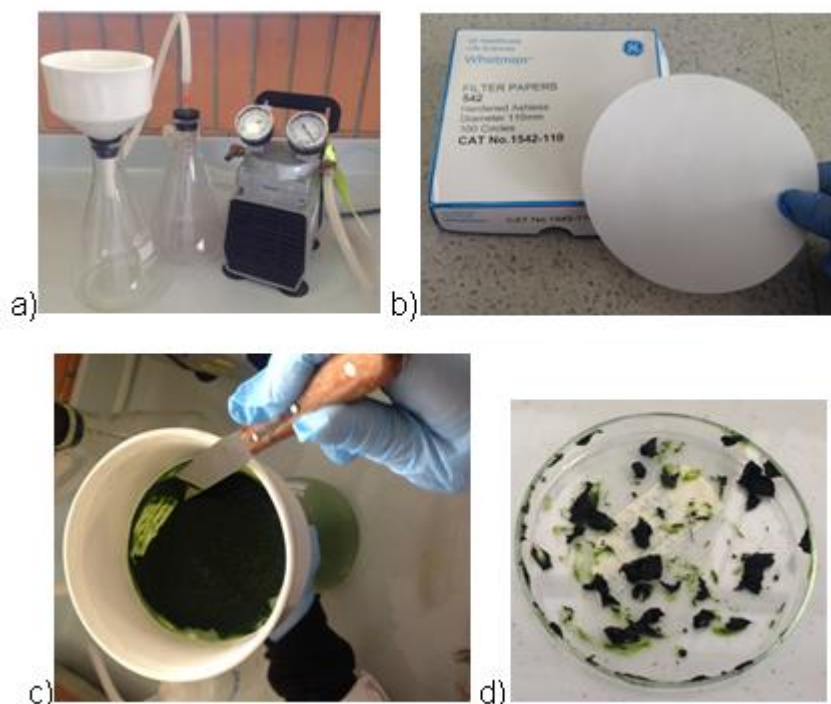


Figura 16. Filtración. (a) Bomba de succión y filtro de porcelana. (b) Filtro Whatman de papel. (c) Muestra filtrada. (d) Biomasa en caja petri.

3.4 Pretratamiento de la biomasa algal

Existen diferentes métodos de disrupción celular para efectivizar la extracción de los lípidos. En este proyecto se utilizó el secado de la biomasa algal en el horno ya que en diferentes fuentes bibliográficas como Amaya & Sarmiento (2010) incluyeron a éste proceso de secado como un pretratamiento. Métodos como la liofilización y disrupción mecánica mediante autoclave se mencionan como protocolos de experimentación con microalgas en la sección 2.3.5.

3.4.1 Secado al horno y trituración de la biomasa algal

Se colocaron las cajas Petri con biomasa filtrada en el horno a una temperatura de 37 °C (Figura 17-a) hasta que esta haya perdido todo el contenido de agua y se aprecie completamente sólido como una piedra para luego ser triturada en los morteros de porcelana (Figura 17-b).

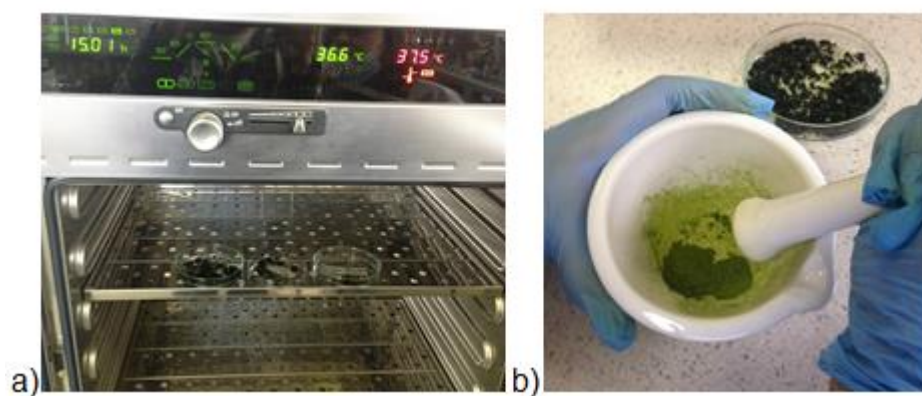


Figura 17. Pretratamiento de biomasa algal. (a) Biomasa algal colocada en el horno. (b) Biomasa sin contenido de agua.

3.5 Metodología de extracción de lípidos y protocolos de experimentación con microalgas

Siendo el objetivo principal de este proyecto la cuantificación de lípidos a partir de la biomasa algal, se realizaron varios experimentos con la biomasa algal. Inicialmente se probaron varios solventes y combinaciones de solventes con el fin de seleccionar los solventes más aptos para la extracción. Luego se realizaron experimentos con biomasa sometida a condiciones de estrés provocado por la disminución de nutrientes en el cultivo. Finalmente se aplicó un pretratamiento de ruptura celular térmico a la biomasa. Todas las extracciones se realizaron utilizando el método de extracción Soxhlet. Se realizaron en total 73 extracciones. Se muestran algunos de los datos necesarios registrados para las extracciones de lípido algal en el laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería (Anexo 4).

3.5.1 Materiales y procedimiento de extracción con el método Soxhlet

El método Soxhlet se utiliza para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica contenidos en un sólido, a través de un solvente compatible. El equipo Soxhlet consta de un condensador, cámara de extracción, brazo para ascenso de vapor, sifón y balón de ebullición. El funcionamiento del equipo se explicó con detalle en la sección 2.3.5.

Proceso de extracción

El equipo de extracción empleado en esta investigación fue: Soxhlet P-Selecta Uniplac de placas circulares 6002316 (Figura 18-a).

- Previo al proceso de extracción, se colocó el balón de ebullición vacío en la estufa a una temperatura de 110 °C durante una hora (Figura 18-b). A continuación se colocó el balón vacío en el desecador durante 30 minutos (Figura 18-c) para finalmente obtener el peso seco del balón de ebullición vacío en la balanza de precisión.

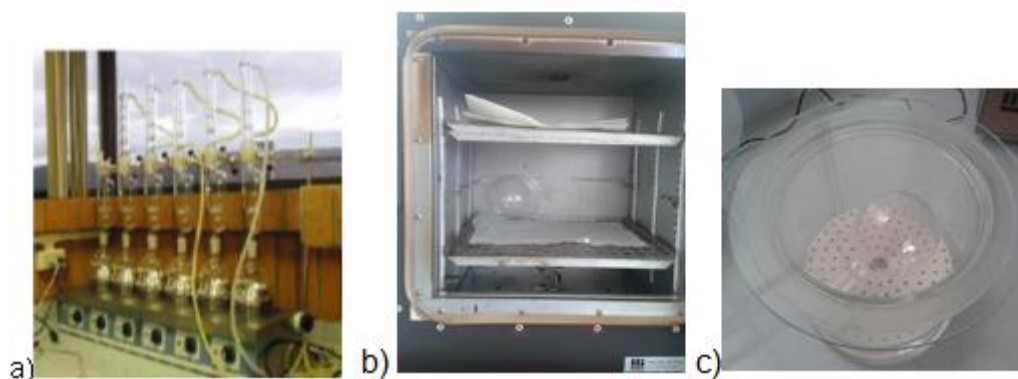


Figura 18. Preparación del Balón de Ebullición. (a)Equipo Soxhlet. (b)Balón de ebullición vacío en la estufa. (c)Balón de ebullición vacío en el desecador.

- Seguido de esto se pesó y taró el cartucho de extracción (Thimble Filters Advantec de 25mm de diámetro por 60mm de altura), en donde se colocó la muestra seca de biomasa algal (Figura 19-a). Luego de pesar el cartucho éste fue colocado en la cámara de extracción Soxhlet (Figura 19-b).

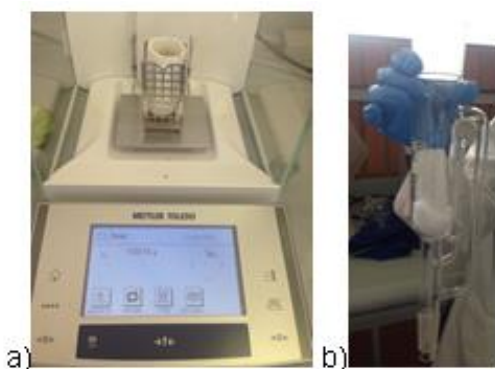


Figura 19. Preparación de cartucho para la extracción. (a) Peso de cartucho con biomasa

algal. (b) Colocación de cartucho en equipo Soxhlet.

- A continuación se preparó el volumen de solvente para la extracción (Figura 20-a), se usaron diferentes solventes como: metanol, cloroformo, n-hexano, etanol, éter dietílico y acetona (Figura 20-b). La justificación científica para el uso y combinación de los solventes se incluye en el apartado 3.5.2 del presente documento. El solvente fue colocado en la cámara de extracción teniendo en cuenta que su volumen sea capaz de alcanzar un sifonamiento en el extractor (Figura 20-c). Se utilizó como mínimo 150 ml de solvente. Para la preparación del solvente se procedió siguiendo un protocolo de seguridad apropiado ya que estos compuestos químicos son tóxicos y pueden ser absorbidos por vía inhalatoria, oral y dérmica. Por lo que se usó un equipo de protección constituido por guantes para examinación, mascarilla y gafas (Figura 20-d).



Figura 20. Preparación de solvente. (a)Volúmen. (b)Solventes. (c)Colocación de solvente en equipo Soxhlet. (d)Equipo de protección.

- Después se conectó el baño termostático a la entrada y salida del

condensador del equipo Soxhlet. El baño termostático permitió la recirculación del agua para el correcto funcionamiento de la condensación. Por la manguera de color amarillo ingresó el agua al equipo de condensación y por la manguera de color blanco regresó al baño termostático. La temperatura del agua dentro del baño termostático se controló para mantener frío el condensador, el rango osciló entre 12 y 20 °C (Figura 21). El baño termostático evitó el desperdicio de agua corriente que usualmente se utiliza en pruebas de destilación en la laboratorio.



Figura 21. Baño termostático.

- Finalmente se acopló la cámara de extracción, el balón de ebullición y el condensador de tal manera que el equipo quede ensamblado como se muestra en la Figura 22.



Figura 22. Equipo Soxhlet ensamblado para extracción.

Una vez ensamblado el equipo, este se conectó a la fuente de energía. Cada solvente tiene un determinado punto de ebullición. Según Ramluckan et al., (2014) se recomienda que la extracción se realice a la temperatura de ebullición de los solventes. El equipo Soxhlet usado en este proyecto contiene un dial como indicador relativo de temperatura, con un rango desde 1 a 12 (Figura 23-b). En el manual de dicho equipo se menciona que las placas circulares calefactoras “SELECTEMP” están diseñadas para trabajar hasta una temperatura máxima de 400°C. Sin embargo no se conocía a que temperatura correspondía cada nivel del indicador, por lo cual se vio la necesidad de determinar la temperatura del equipo utilizando un termómetro Infrarrojo. El método se detalla a continuación.

Medida de la Temperatura en el equipo Soxhlet.

Para determinar la temperatura en cada nivel del botón del termostato se realizó una prueba utilizando un termómetro infrarrojo para alta temperatura con puntero láser marca Extech modelo 42545 (Figura 23-a). Para empezar, el equipo soxhlet se ensambló de tal manera que simulara un ensayo de extracción, en los balones de ebullición se colocó agua en lugar de solventes y la cámara de extracción se mantuvo vacía. Cada placa circular se fijó en un nivel de temperatura desde el 3 hasta el 8 (Figura 23-b). La temperatura fue registrada cada 15 minutos.

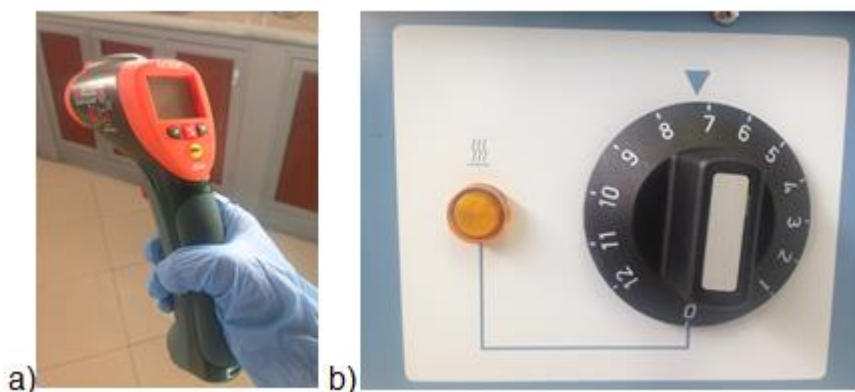


Figura 23. Medida de la Temperatura. (a)Termómetro Infrarrojo. (b)Botón de termostato.

Obtención de lípido algal.

El lípido algal fue obtenido mediante la extracción sucesiva por la recirculación del solvente, debido a que el solvente se calienta y se evapora, mientras los lípidos extraídos permanecen en el fondo del balón de ebullición. Este ciclo se repitió hasta que no hubo más lípidos que extraer en la cámara de extracción. Este punto se pudo apreciar en forma visual cuando el solvente recuperó su color inicial (transparente) dentro de la cámara de extracción (Figura 24-a). Una vez realizado el último sifonamiento se retiró el balón de ebullición junto con la cámara de extracción para retirar el cartucho y verter el solvente nuevamente dentro del balón de ebullición (Figura 24-b).

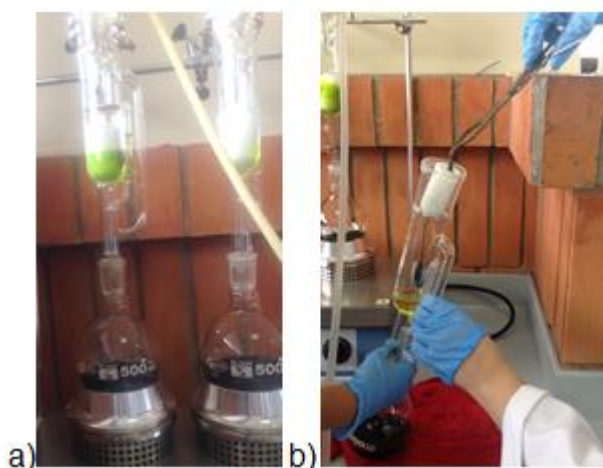


Figura 24. Obtención de lípido algal. (a) Solvente transparente dentro de la cámara de extracción. (b) Retiro del cartucho con residuo algal.

Recuperación de solvente

Mediante la destilación se recuperó la mayor cantidad de solvente desde la cámara de extracción antes que se produzca un sifonamiento (Figura 25-a), procurando que el lípido obtenido dentro del balón de ebullición no se queme. Los solventes recuperados de las diferentes extracciones se almacenaron en envases herméticos (Figura 25-b). Estos se guardaron en un lugar lejos de la luz para evitar reacciones químicas dentro de los envases evitando que su composición cambie (Figura 25-c).



Figura 25. Recuperación de solvente. (a)Recuperación de solvente. (b)Envases Herméticos. (c)Almacenamiento de solventes.

Separación del solvente del lípido algal

Terminado el proceso de extracción de lípidos y recuperación de solvente, se secó el balón de ebullición en una estufa durante una hora a una temperatura de 110 °C para evaporar el solvente (Figura 26-a). Para obtener el peso seco del balón de ebullición con lípido algal, se colocó durante 30 minutos en el desecador (Figura 26-b) y se procedió a pesar en la balanza analítica (Figura 26-c).

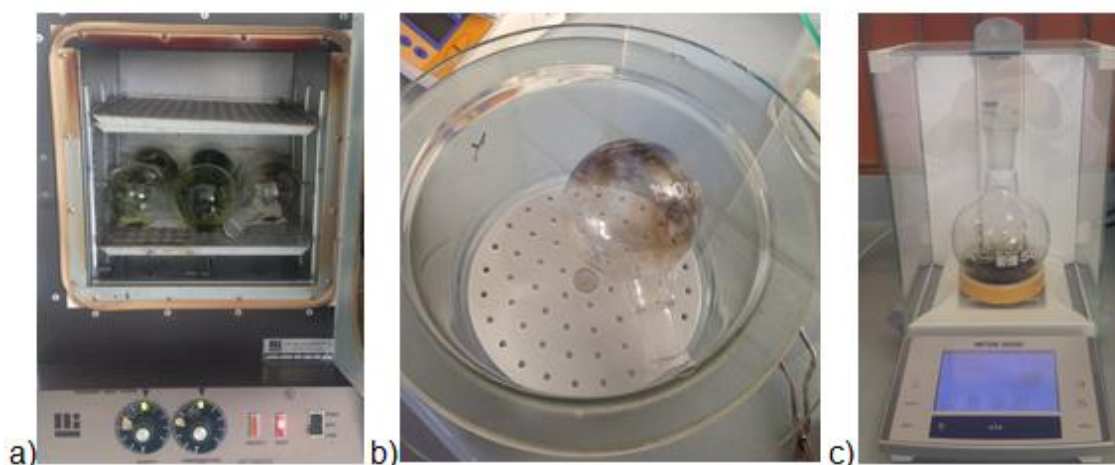


Figura 26. Separación del solvente del lípido algal. (a)Secado en el horno del balón de ebullición con lípido algal. (b)Dsecación del balón de ebullición con lípido algal. (c)Peso del balón de ebullición con lípido algal seco.

Cuantificación del lípido algal

Los solventes utilizados para la extracción de lípidos no tienden a discriminar



los componentes presentes en las microalgas cuando se realiza la extracción. Esto implica que la clorofila y productos asociados a una degradación formarían parte del extracto del lípido (Ramluckan et al., 2014). Por lo tanto, la cantidad de extracto obtenido de las extracciones realizadas en el proyecto fue de lípido más clorofila, el cual se determinó mediante la Ecuación 1.

$$\% \text{ de lípido extraído + clorofila} = \frac{P_l - P_v}{\text{peso de muestra algal seca}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

P_l : Peso del balón de ebullición más lípido algal y clorofila.

P_v : Peso del balón de ebullición vacío.

3.5.2 Selección de solventes orgánicos.

Ramluckan et. al., (2014) evaluaron la eficiencia de extracción usando diferentes solventes para la extracción de lípidos y su análisis mostró que el Etanol, Cloroformo y Hexano fueron más eficientes en la extracción de lípidos dando porcentajes lipídicos mayores al 10%. Gonzáles. Et. al., (2009) mencionan que el éter dietílico se recomienda por ser un solvente no polar que es selectivo al extraer lípidos no polares de las microalgas como los triglicéridos los cuales son ideales para la producción de biodiesel. Gonzáles. Et. al., (2009) también mencionan que un solvente apolar, el cual disuelve los lípidos neutros, en combinación con un solvente relativamente polar, el cual disuelve los lípidos polares presentes en la muestra sometida a extracción, extrae lípidos polares como no polares, en este caso las mezclas binarias de metanol:cloroformo y etanol:cloroformo son un claro ejemplo. Por esta razón seis solventes fueron seleccionados en este proyecto que abarcan una gama de polaridades y densidades como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Propiedades relevantes de los solventes usados (Ramluckan et al., 2014).

	Solvente	Indice de Polaridad Unidades	Punto de Ebullición °C	Densidad a 25°C g/mL
1	Hexano	0,1	69,0	0,659
2	Eter Dietílico	2,8	34,6	0,706
3	Cloroformo	4,1	60,5-61,5	1,492
4	Acetona	5,1	56,0	0,791
5	Metanol	5,1	64,7	0,792
6	Etanol	5,2	78,0	0,789
	Agua (solo para comparación)	10,2	100,0	1,000

La metodología de extracción que se utilizó fue con solventes individuales y mezclas binarias de solventes. Las diferentes extracciones para las familias *Chlorella* y *Scenedesmus* en cuanto al uso de solventes individuales se realizó usando solo cloroformo, etanol, n-hexano y éter dietílico. En cuanto a las combinaciones binarias realizadas fueron, cloroformo:metanol (1:2), metanol:n-hexano (1:3), cloroformo:etanol (1:3), etanol:hexano (1:3), cloroformo:etanol (1:1), éter dietílico:etanol (1:1), cloroformo:hexano (1:2) y por último hexano:acetona (1:1).

Para efectos de optimizar los procesos experimentales y los recursos, se realizó la extracción utilizando los solventes mencionados en una primera etapa únicamente con las especies *Chlorella* y *Scenedesmus*. El análisis de los resultados obtenidos en esta primera etapa sirvieron para seleccionar 4 diferentes combinaciones de solventes que dieron los mejores resultados (mayores concentraciones lipídicas) en las especies estudiadas.

Para las especies, *F.F. Especie 1*, *F.F. Especie 3* y *H1* se realizaron las extracciones con las combinaciones de solventes seleccionadas en la etapa previa.



3.5.3 Productividad de lípidos con las microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* cultivadas bajo diferentes condiciones de nutrientes

Uno de los mayores retos en el cultivo de microalgas para utilización como biocombustibles ha sido determinar la cantidad ideal de nutrientes suministrados. Como se mencionó en el acápite 0 del presente documento, una disminución de los nutrientes en el medio de cultivo ocasiona mayores concentraciones de lípidos en la biomasa algal. Sin embargo, una menor cantidad de nutrientes en el medio del cultivo ralentiza el crecimiento disminuyendo la productividad del cultivo. Por este motivo, se aplicó un proceso de cultivo en dos etapas utilizando las especies *Chlorella* y *Scenedesmus* para dicho experimento.

En la primera etapa se proporcionó al cultivo una fuente de carbono y nutrientes según las tasas de crecimiento estudiadas por Cabrera & Pulla (2014), en donde se menciona que la cantidad de alimento que genera la mayor tasa de crecimiento en la fase exponencial es, bicarbonato = 0.07 g/l y nutrientes=0.1 g/l.

En la segunda etapa se sometió al cultivo a condiciones de estrés, reduciendo la cantidad de nutrientes a la mitad. En cuanto al proceso de extracción en esta segunda etapa, los solventes utilizados fueron los seleccionados como los más eficientes en la extracción según lo determinado anteriormente.

3.5.4 Pretratamiento de disrupción celular térmico.

Liofilización

La técnica de liofilización se usa para deshidratar la biomasa con la finalidad de obtener biomasa algal seca y además conservar la composición bioquímica de ésta. Ésta técnica produce la rotura de las células para facilitar los procedimientos posteriores (Richmond, 2004) y; consiste en tres fases:

1. Congelación para solidificar la muestra, aproximadamente a -80°C por lo menos durante dos horas.
2. Secado primario por sublimación para reducir la humedad.
3. Secado secundario para reducir la humedad restante.

Este proceso duró alrededor de 24 horas y fue realizado en el laboratorio del Proyecto “Plantas Medicinales”, en la facultad de Química de la Universidad de Cuenca. Para este procedimiento se usó un Liofilizador LABCONCO FreeZone de 2.5 litros con una plataforma de 12 puertos (Figura 27) (Cabrera & Pulla, 2014). En el proyecto las extracciones realizadas con muestras liofilizadas fueron para la familia *Chlorella*.



Figura 27. Equipo de Liofilización

Autoclavado

El autoclavado se realizó con el fin de aumentar la productividad de los lípidos ya que produce una disrupción mecánica de las células por lo que el solvente puede penetrar con mayor facilidad en su estructura. La biomasa algal seca sin triturar de la familia *Chlorella* se sometió a este procedimiento durante 30 min a una presión de 100 MPa y 100°C en un autoclave marca Trident modelo EA-

632 (Figura 28-a), previamente la muestra se colocó en una caja petri, se envolvió en papel aluminio y papel vegetal (Figura 28-b). En cuanto a la extracción con la biomasa autoclavada los solventes utilizados fueron los seleccionados como más eficientes en la extracción como se detalló anteriormente.

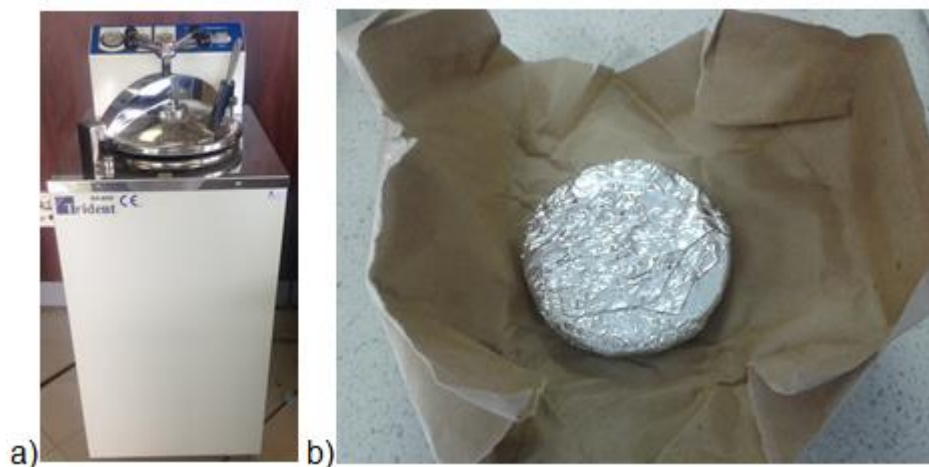


Figura 28. Autoclavado. (a)Equipo. (b)Muestra de biomasa.



CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente sección se muestra los resultados obtenidos en todos los procesos experimentales realizados. En primer lugar, se detalla el análisis y control de los parámetros ambientales para el óptimo crecimiento de las microalgas de las 5 familias: *Chorella*, *Scenedesmus*, *FF. Especie 1*, *FF. Especie 3* y *H1*. A continuación se muestra el análisis cuantitativo de la composición de lípidos con procedimientos gravimétricos para familias de microalgas citadas. Posteriormente se muestra los resultados del análisis de la temperatura de los distintos niveles de regulación del termostato del equipo Soxhlet. Se presenta también los resultados del análisis de la eficiencia para la extracción de lípidos con el método Soxhlet realizado con los diferentes solventes y combinaciones de solventes utilizados. Con base en los análisis precedentes, se presenta los resultados del estudio de la producción de lípidos de las microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* cultivadas bajo diferentes concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo. Finalmente se detalla los resultados de la aplicación del pretratamiento de disrupción celular térmico por autoclave a la biomasa de la microalga *Chlorella* en comparación con la productividad de lípido encontrada en la biomasa sin pre-tratamiento.

4.1 Condiciones ambientales para el crecimiento de microalgas

Agitación. Las condiciones de agitación y airación que recibieron los fotobioreactores en toda la experimentación correspondieron a un valor de 150 revoluciones por minuto (rpm). La agitación mostró gran eficiencia en la homogenización del cultivo debido a que las células de algas la mayor parte del tiempo no se adherían a las paredes de los fotobioreactores, en la Figura 29 se puede evidenciar claramente lo mencionado.

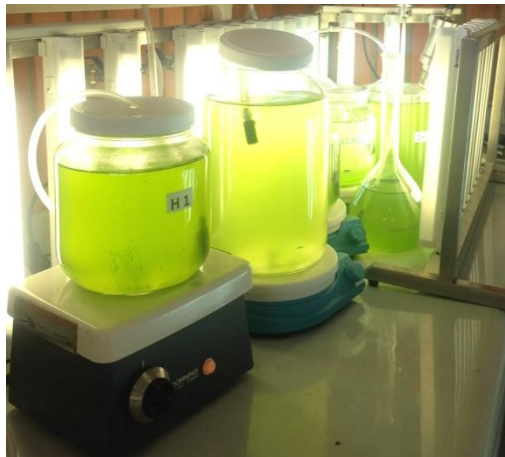


Figura 29. Reactor homogenizado por el sistema de agitación.

pH. El rango de pH estuvo entre 7.4 y 10.5 para la especie *Chlorella*. En el Anexo 1 se muestra el monitoreo de este parámetro.

Fuentes de carbono y nutrientes. En el Anexo 2 se muestra la forma en la que se llevó el control de la fuente de carbono inorgánico y nutrientes. Los valores típicos utilizados fueron: bicarbonato = 0.07 g/l y nutrientes (combinación de nitrógeno, fósforo y potasio, NPK) = 0.1 g/l.

4.2 Producción de Biomasa algal

4.2.1 Cosecha

Se realizó la medición de turbiedad con el fin de separar la biomasa del cultivo cuando el crecimiento esté en la fase estacionaria. Para ello se monitoreó diariamente la turbiedad de cada familia de microalgas. Cuando el valor de la turbiedad comenzó a decrecer, éste era un claro indicador de que las células de las microalgas iniciaban la fase de declinación o muerte por lo que se debía realizar la cosecha inmediatamente. La Tabla 7 indica los valores de turbiedad de las familias de microalgas durante un cultivo.

Tabla 7. Monitoreo de turbiedad de un cultivo de las familias de microalgas.

Especie Día	Turbiedad (NTU)				
	F. F. Especie 3	Scenedesmus	F.F. Especie 1	Chlorella	H1
1	13,06	18,7	16,62	20,51	14,57
2	14,01	22,37	18,48	30,17	15,23
3	-	26,72	-	38,48	15,79
4	-	38,52	-	51,07	21,92
5	14,83	-	35,97	68,85	18,55
6	15,28	-	45,06	-	
7	16,95	39,07	55,36	75,43	
8	18,14	54,74	60,84	84,13	
9	24,88	59,31	69,48	83,70	
10	-	66,21	68,37		
11	-	65,48			
12	27,31				
13	26,49				

(Nutrientes suministrados: 0,1 g/l; Bicarbonato suministrado: 0,07 g/l)

La tabla indica que la familia *F.F. Especie 3* es la que se cosecha en un mayor tiempo similar a las familias *FF. Especie 1* y *Secenedesmus* que se cosechan entre 9 y 13 días, estos valores son mucho mayores al tiempo de cultivo de la familia *H1* con 6 días. Sin embargo el tiempo no garantizó mayor producción de biomasa ya que en las familias *Chlorella* y *H1* se puede notar gran diferencia de valores de turbiedad de 84.13 y 21.92 NTU, respectivamente. Lo que indicó que la familia *Chlorella*, *Scenedesmus* y *F.F. Especie 1* tenían mayor capacidad de reproducirse a comparación de las familias *F.F. Especie 3* y *H1*.

4.2.2 Sedimentación

Cuando se separó la biomasa de los cultivos de las familias de microalgas, se almacenaron en refrigeración para su sedimentación. Se observó que las familias *Scenedesmus* y *H1* se sedimentaron en un menor número de días a comparación de las familias *F.F. Especie 1*, *F.F. Especie 3* y *Chlorella* (Figura 30) lo que denota que existen diferencias en las estructuras coloniales de las

familias de microalgas que alteran su sedimentación.

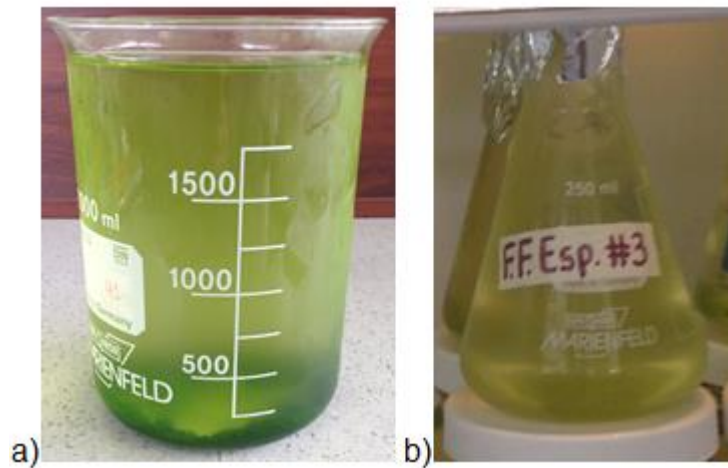


Figura 30. Sedimentación de microalgas en 1 día. (a) Familia H1. (b) Familia F.F. Especie 3.

4.2.3 Centrifugación

Una vez sedimentada la biomasa en los matraces ésta se recolectó para someterla a centrifugación. Se pudo evidenciar que las familias *H1* y *F.F. Especie 1* requerían de un mayor tiempo y número de revoluciones por minuto que la asignada para las familias *Chlorella* y *F.F. Especie 3*. Cabe destacar que la familia *Scenedesmus* centrifugada no contenía partículas suspendidas al contrario de las otras familias.

4.2.4 Filtración y secado

Para retirar el contenido de agua de la biomasa algal se procedió a filtrar las muestras. Las familias *Scenedesmus* y *Chlorella* mostraron una separación de sólidos inmediata al poner en funcionamiento la bomba de succión resultando con un contenido de humedad menor; al contrario de la familia *H1*, *F.F. Especie 1* y *F.F. Especie 3* que resultaban con contenidos de humedad mayor después del mismo proceso de filtración. Esta diferencia en el filtrado ocasionó naturalmente diferencias en el tiempo de secado al horno a una temperatura de 37 °C variando dependiendo de cada familia, por lo que para la microalga *Chlorella* se requirió entre 4 a 5 horas, para *Scenedesmus* entre 6 a 7 horas; y

para *H1*, *F.F. Especie 1* y *F.F. Especie 3* entre 20 a 24 horas.

4.3 Cuantificación de la composición oleaginosa de distintas familias de microalgas

En esta sección se muestra los resultados de la concentración de lípidos en microalgas bajo todas las condiciones experimentales realizadas. En primer lugar, sin embargo se detalla los procesos previos realizados con el equipo instrumental para verificar las condiciones exactas de temperatura en cada proceso de extracción de lípidos con la técnica Soxhlet.

4.3.1 Temperatura de Equipo Soxhlet

En la Tabla 8 se muestran los resultados del experimento realizado para determinar la temperatura en cada nivel del termostato. Durante 2 h 45 min, cada 15 minutos se tomó la temperatura en cada nivel del indicador desde el numeral tres hasta el ocho. Se destaca la importancia de esta verificación por las distintas propiedades de los solventes utilizados que tienen distintas temperaturas de ebullición y la necesidad de realizar una gran cantidad de ensayos en condiciones óptimas, que implica minimizar el tiempo de extracción y al mismo tiempo no afectar la eficiencia de la extracción (cumplir los ciclos de sifonamiento del solvente requeridos).

Tabla 8. Temperatura en Equipo Soxhlet.

HORA	NIVEL SOXHLET - TEMPERATURA °C					
	8	7	6	5	4	3
0:00	22,6	22,9	22,6	22,9	22,4	23,0
0:15	42,3	37,8	35,4	32,7	30,9	27,2
0:30	73,2	61,9	53,7	48,1	43,2	34,6
0:45	83,2	79,3	70,3	62,0	55,5	42,5
1:00	83,6	83,8	83,0	73,6	64,2	50,1
1:15	83,6	84,2	83,7	82,0	72,3	56,8
1:30	84,1	84,1	83,5	83,2	76,3	61,7
1:45	83,8	84,2	83,4	83,6	83,0	64,8
2:00	83,4	84,1	83,2	84,6	84,6	68,1
2:15	83,5	83,7	82,5	84,5	84,5	69,8
2:30	83,5	84,1	82,8	86,2	84,3	71,4

La Figura 31 se construyó con base en la Tabla 8 para visualizar el comportamiento de la temperatura. En esta se puede observar que la temperatura sufre un incremento continuo durante aproximadamente 1 h 30 min, al colocar el dial del termostato en casi todos los niveles. A partir de este tiempo la temperatura permanece constante para todos los niveles a partir del nivel 5, con alrededor de 84 °C. Sin embargo, en los niveles 3 y 4, la temperatura tardó más en llegar a un valor relativamente constante, llegando a valores aproximados de 67 y 83 °C, respectivamente.

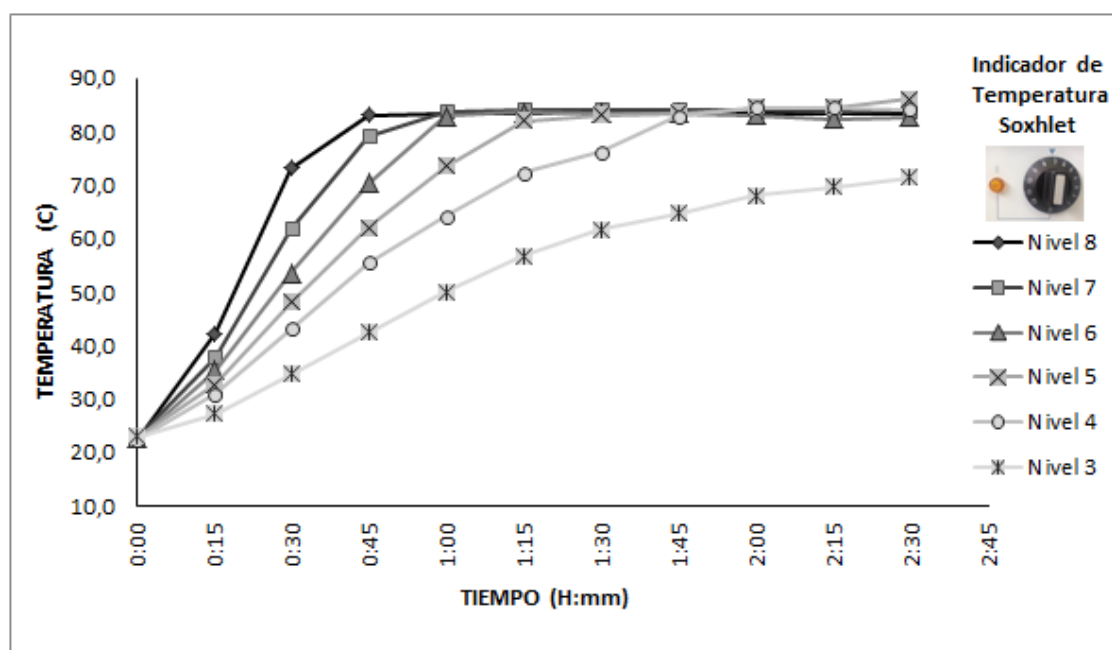


Figura 31. Temperatura del Equipo Soxhlet.

4.3.2 Extracción de lípidos con multisolevantes de varias familias de microalgas

A continuación se presenta los resultados de las extracciones de lípidos utilizando el método Soxhlet de las familias de microalgas estudiadas en este proyecto: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *F.F. Especie 1*, *F.F. Especie 3* y *H1*. Estas familias de microalgas fueron sometidas a las mismas condiciones de cultivo en cuanto a luz, agitación, temperatura del ambiente, aireación y fuentes de carbono y nutrientes (Nutrientes = 0.1 g/l, Bicarbonato = 0.07 g/l). Los



porcentajes de lípido más clorofila para todas las extracciones realizadas en este proyecto así como el tiempo de extracción se muestran en detalle en el Anexo 3.

Familia Chlorella

Para la familia *Chlorella* se realizaron extracciones con solventes individuales y mezclas binarias de solventes. Estas fueron cloroformo, etanol, n-hexano, éter dietílico, cloroformo:metanol (1:2), metanol:n-hexano (1:3), cloroformo:etanol (1:3), etanol:hexano (1:3), cloroformo:etanol (1:1), éter dietílico:etanol (1:1), cloroformo:hexano (1:2) y por último hexano:acetona (1:1).

A continuación se muestra los resultados mediante un gráfico de barras en la Figura 32. Los resultados muestran el promedio de los análisis duplicados realizados con cada solvente y combinación binaria de éstos, también se incluye el error relativo. Los valores más altos (> 16 %) de lípido extraído fueron alcanzados con la mezcla binaria cloroformo:metanol (1:2), metanol:hexano (1:3), etanol y cloroformo:etanol (1:3), con un tiempo de extracción promedio de 4 h 30 min. Los solventes restantes arrojaron porcentajes de lípidos extraídos entre 5 % y 15 %.

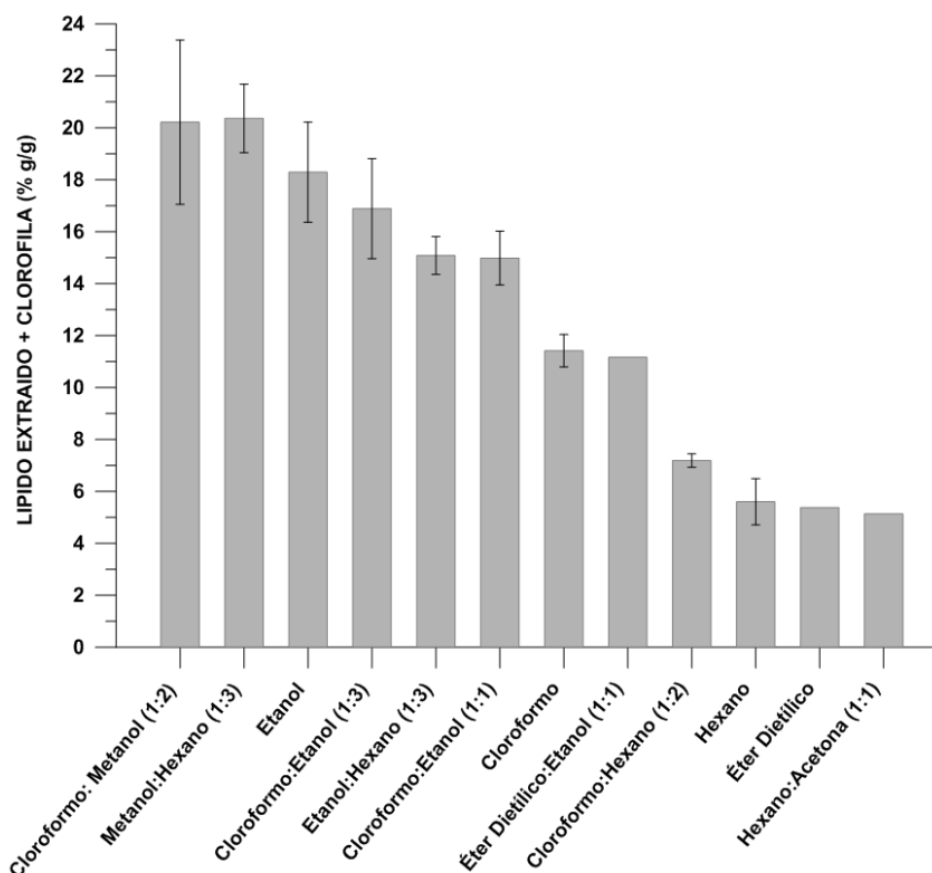


Figura 32. Porcentaje de lípido y clorofila extraído por el método Soxhlet utilizando, solventes individuales y mezclas binarias para la familia *Chlorella*.

Basado en el principio de extracción donde lo “semejante disuelve lo semejante” el alto porcentaje de lípido obtenido con la mezcla cloroformo:etanol (1:3) indicó que la especie *Chlorella* contiene cantidades de lípidos polares y neutros. Cuando las extracciones se realizaron utilizando un solvente con etanol el porcentaje fue superior al 18 % y con cloroformo fue mayor al 11 %. Cuando se compararon estos con el valor obtenido usando la mezcla binaria cloroformo:etanol (1:3) el porcentaje de lípidos fue mayor al 14 % lo que indica que la combinación de solventes mejora la eficiencia del solvente que individualmente extraen un porcentaje menor de lípidos. La mejor eficiencia de extracción fue producida por la mezcla metanol:hexano (1:3) con un porcentaje de lípidos de 20.37 % con una mínima diferencia con la mezcla cloroformo:metanol (1:2) con un porcentaje del 20.22 %.



El porcentaje de lípido extraído con éter dietílico fue de 5.38 %, al ser este un solvente no polar los lípidos obtenidos en su mayoría no fueron apolares. Cabe mencionar que al utilizar este solvente, se tuvieron ciertos inconvenientes debido a su alta volatilidad, ya que se evaporó gran cantidad de éste durante la extracción del lípido, esto impidió el sifonamiento del mismo en la cámara de extracción por lo que se tuvo que agregar continuamente una cantidad adicional de solvente en la cámara de extracción. Su olor característico y toxicidad impidió que éste se pueda usar en la familia *Scenedesmus*.

Familia Scenedesmus

Para la familia *Scenedesmus* se realizaron extracciones con solventes individuales y mezclas binarias de solventes. Estas fueron cloroformo, etanol, n-hexano, cloroformo:metanol (1:2), metanol:n-hexano (1:3), cloroformo:etanol (1:3), etanol:hexano (1:3), cloroformo:etanol (1:1), cloroformo:hexano (1:2) y por ultimo hexano:acetona (1:1).

Los resultados de porcentajes de lípidos más clorofila y su valor relativo se ilustran en la Figura 33. Los valores más altos (> 17 %) de lípido extraído fueron alcanzados con las mezclas binarias cloroformo:metanol (1:2), metanol:hexano (1:3), etanol y cloroformo:etanol (1:3), con un tiempo de extracción promedio de 4 h 50 min. Los porcentajes de lípidos obtenidos con las mezclas metanol:hexano (1:3), etanol y cloroformo:etanol (1:3) no evidencian una gran variabilidad en sus valores, los cuales son de 17.95 %, 16.86 % y 17.59 %, respectivamente. El porcentaje más bajo de extracción fue con el solvente n-hexano con un valor de 7.04 %.

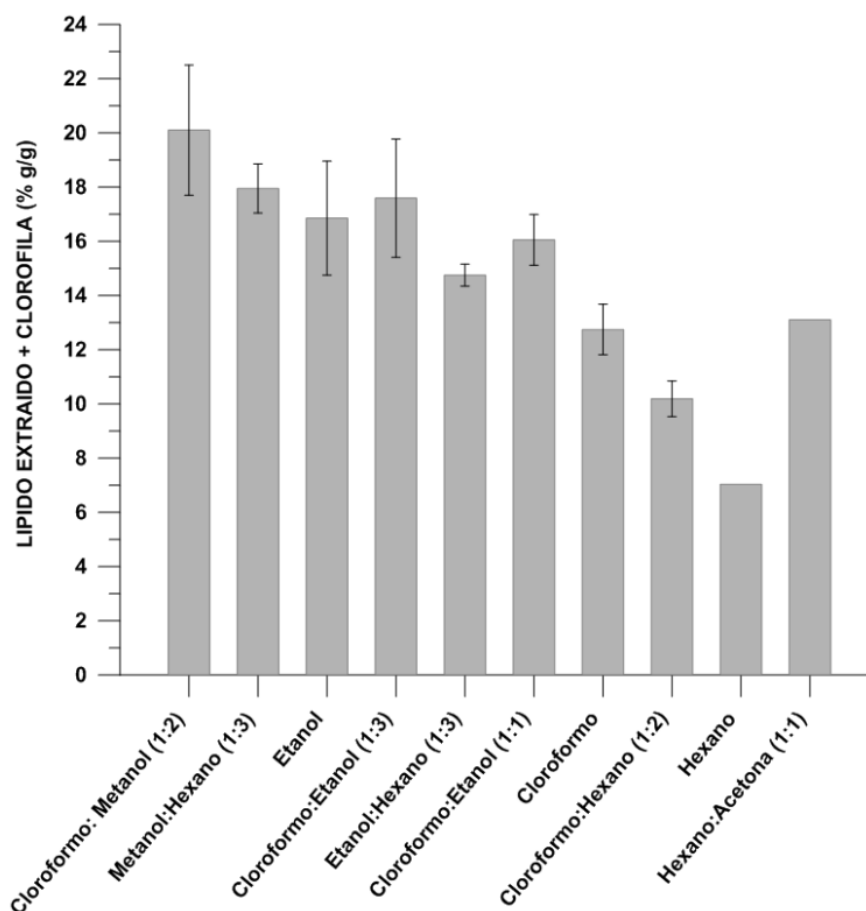


Figura 33. Porcentaje de lípido y clorofila extraído por el método Soxhlet utilizando, solventes individuales y mezclas binarias para la familia *Scenedesmus*.

F.F. Especie 3, F.F. Especie 1 y H1

Debido a que con las mezclas de solventes cloroformo:metanol (1:2), metanol:hexano (1:3), etanol y cloroformo:etanol (1:3), fue obtenida una eficiencia de extracción mayor que las otras mezclas de solventes utilizados con las familias *Chlorella* y *Scenedesmus*; éstas combinaciones de solventes fueron seleccionadas para la extracción de lípidos con las familias *F.F. Especie 3*, *F.F. Especie 1* y *H1*. Los resultados de porcentajes de lípidos más clorofila y su valor relativo se ilustran en la Figura 34.



Para la familia **F.F. Especie 3** se evidenció que el valor más alto de porcentaje de lípido extraído más clorofila fue con la mezcla metanol:hexano (1:3) de 19.17 %, seguido está con 18.31 % la mezcla cloroformo:metanol (1:2). Con el solvente etanol se obtuvo 13.53 % de lípido más clorofila y con la mezcla cloroformo:etanol (1:3) un valor de 12.69 % (Figura 34-a). Las dos primeras mezclas no presentaron una mayor variación en el porcentaje de lípidos más clorofila extraído por lo que cualquiera de estas pudiera ser elegida como la más eficiente en la extracción de lípidos para esta especie.

Para la familia **F.F. Especie 1** el valor más alto de porcentaje de lípido más clorofila extraído es con la mezcla cloroformo:metanol (1:2) de 17.69 %; mientras que con la mezcla metanol:hexano (1:3) el valor es de 13.96 %. La extracción realizada con etanol resultó en un 9.23 % de lípido más clorofila. La mezcla cloroformo:etanol (1:3) dio el valor más bajo, resultando de 5.77 % (Figura 34-b).

Para la familia **H1** el valor más alto de porcentaje de lípido extraído más clorofila es con la mezcla cloroformo:metanol (1:2) de 5.46 %, con la mezcla metanol:hexano (1:3) el valor es de 4.49 %. La extracción realizada con etanol fue de 3.91 % de lípido más clorofila. La mezcla cloroformo:etanol (1:3) dio el valor más bajo 2.92 % (Figura 34-c). Se puede observar que todos los valores de porcentaje de lípido más clorofila para esta especie fueron relativamente bajos.

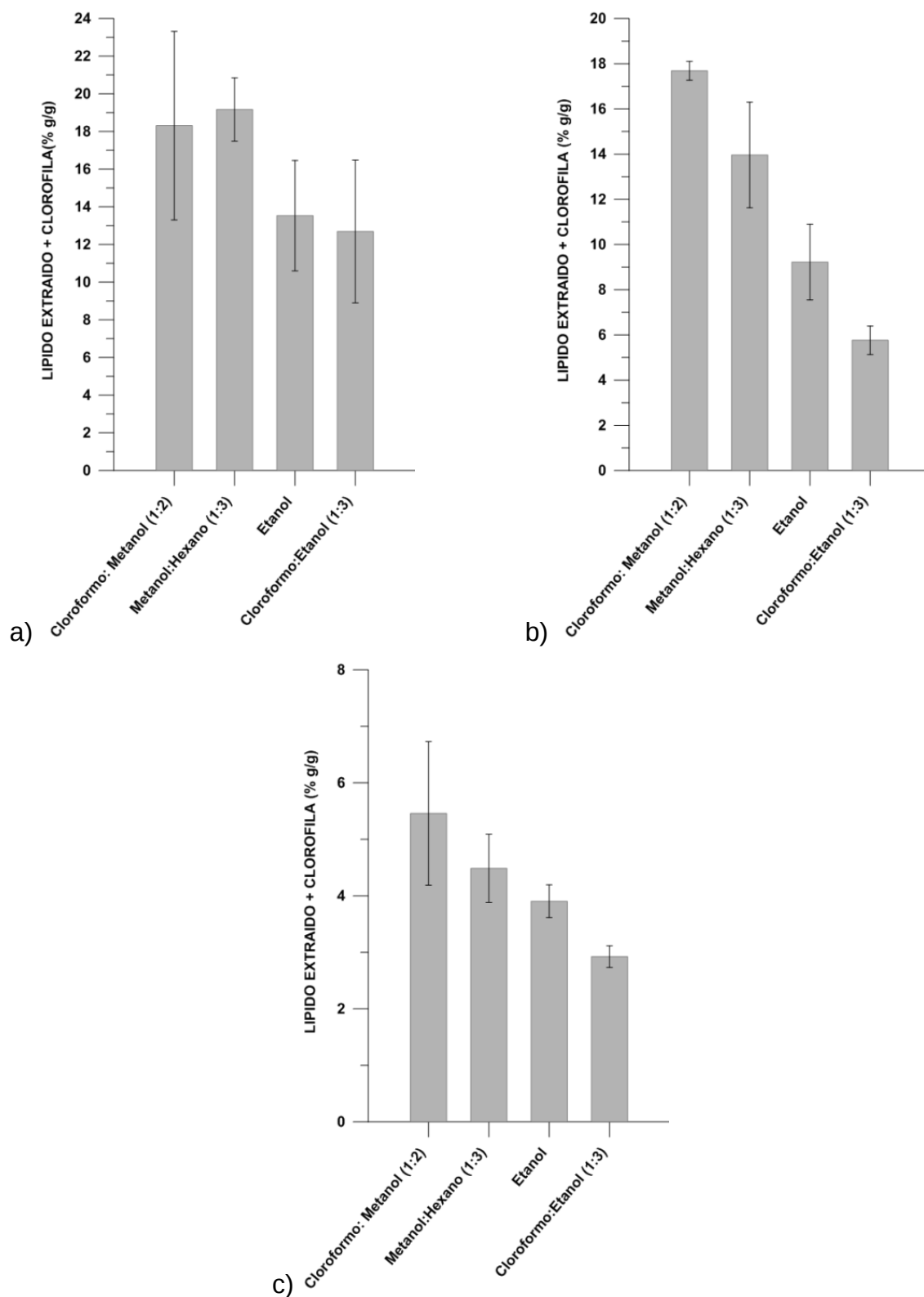


Figura 34. Porcentaje de lípido y clorofila extraído por el método Soxhlet utilizando,



solventes individuales y mezclas binarias para las familias (a) F.F. Especie 3, (b) F.F. Especie 1 y (c) H1.

A continuación se compara el porcentaje de lípidos más clorofila obtenido para todas las especies de microalgas, utilizando las cuatro mezclas con los valores más altos de lípidos más clorofila obtenidos en los experimentos iniciales con las familias *Chlorella* y *Scenedesmus* (Figura 35).

La Figura 35-a corresponde a la extracción de lípidos más clorofila con la mezcla **cloroformo:metanol (1:2)** en donde se evidencia que los porcentajes están entre el 17.69 % y 20.22 % para las familias de *Chlorella*, *Scenedesmus*, *F.F. Especie 1* y *F.F. Especie 3*. El mayor porcentaje de lípidos más clorofila extraído fue con la familia *Chlorella* con un valor de 20.22 % y para *Scenedesmus* 20.10 %. Con 17.69 % y 18.31 % para las familias *F.F. Especie 1* y *F.F. Especie 3*, respectivamente. El porcentaje de lípido más clorofila con esta mezcla para la familia *H1* resulta mucho menor que para las otras especies.

La Figura 35-b corresponde a la extracción de lípidos más clorofila con la mezcla **metanol:hexano (1:3)**. En esta se puede observar que los porcentajes de lípidos más clorofila más altos son de 20.37 %, 19.17% y 17.95 % correspondientes a las familias *Chlorella*, *F.F. Especie 3* y *Scenedesmus*, respectivamente. La familia *F.F. Especie 1* tiene un contenido de lípidos más clorofila de 13.96 % para esta combinación. La familia *H1* según los ensayos experimentales realizados con esta combinación no presenta valores relevantes de contenido lipídico, resultando en 4.49 %.

La Figura 35-c corresponde a la extracción de lípidos más clorofila con el solvente **etanol**. En esta se puede observar que los porcentajes de lípidos más clorofila más eficientes son de 18.29 % y 16.86 % correspondientes a las familias *Chlorella* y *Scenedesmus*. Con valores menores pero que no se consideran deficientes en la extracción de lípidos más clorofila están las



familias de *F.F. Especie 1* y *F.F. Especie 3* con valores de 9.23 % y 13.53 %, respectivamente. La familia *H1* con esta combinación no presenta valores relevantes de contenido lipídico siendo éste de 3.91 %.

La Figura 35-c corresponde a la extracción de lípidos más clorofila con la mezcla **cloroformo:etanol (1:3)** en donde se evidencia que los porcentajes más eficientes de lípidos más clorofila son 16.89 % y 17.59 % para las familias de *Chlorella* y *Scenedesmus*, respectivamente. Con 12.69 % se encuentra la familia *F.F. Especie 3*. El porcentaje de lípido más clorofila con esta mezcla de las familia *F.F. Especie 1* y *H1* resultó mucho menor que para las otras especies con 5.77 % y 2.92 %, respectivamente.

Las familias *Chlorella*, *Scenedesmus* y *F.F. Especie 3* producen un mayor porcentaje de lípidos más clorofila a comparación de la familia *H1* que tiene porcentajes relativamente bajos. La familia *F.F. Especie 1* presenta una producción de lípidos baja a comparación de las familias antes mencionadas.

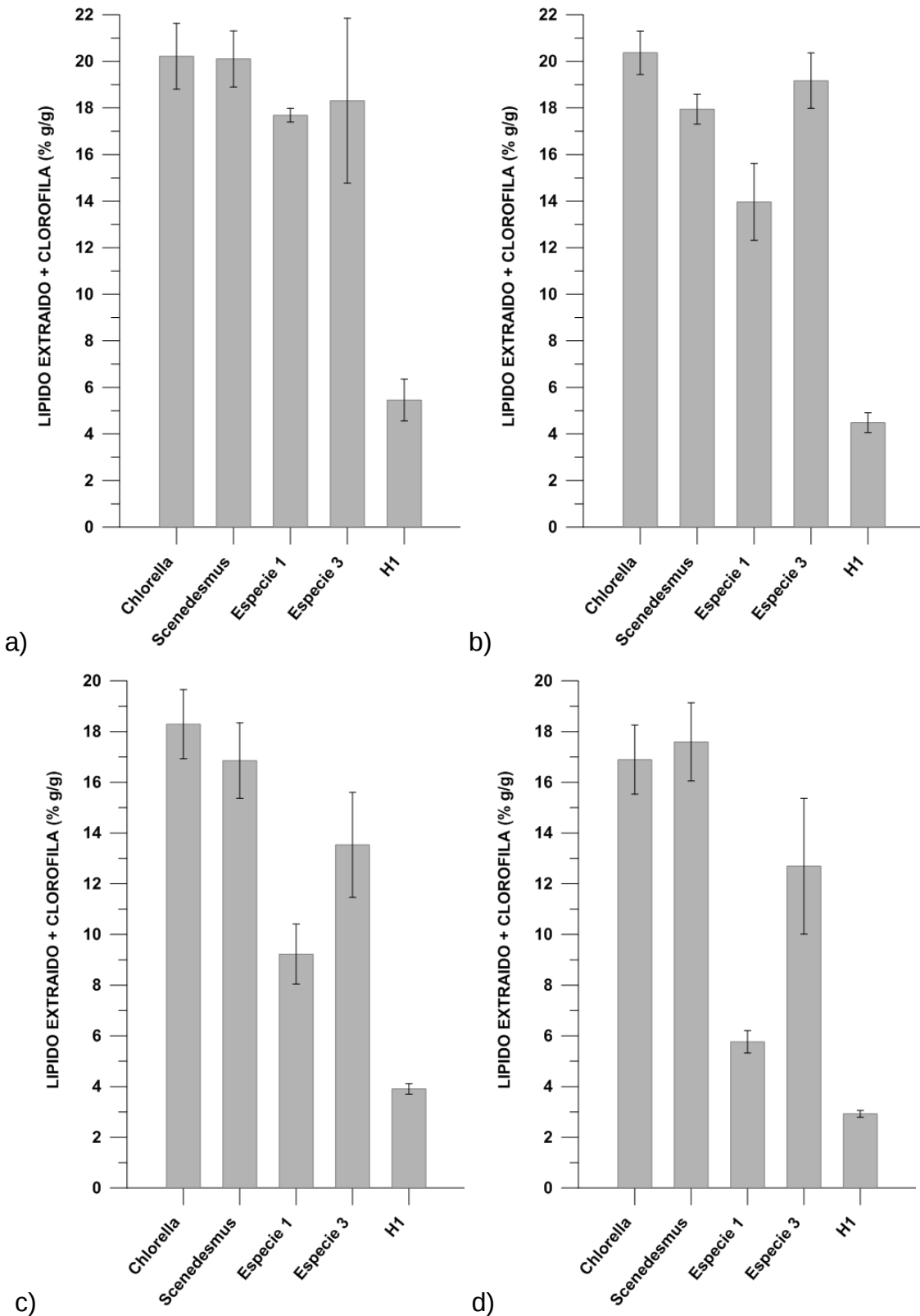


Figura 35. Porcentaje de lípidos más clorofila con las cuatro mezclas de solvente más

eficiente de extracción. (a)cloroformo:metanol (1:2). (b)metanol:hexano (1:3). (c)etanol. (d)cloroformo:etanol (1:3).

4.3.3 Productividad de lípidos bajo diferentes condiciones de nutrientes

Se experimentó una segunda etapa de cultivo durante tres semanas en la que se sometió a las familias *Chlorella* y *Scenedesmus* a condiciones de estrés con un suministro de nutrientes igual a la mitad de la concentración utilizada en condiciones ideales de crecimiento. Estas concentraciones de nutrientes fueron de 0.05 g/l de NPK y 0.07g/l de bicarbonato.

En esta etapa se midió la turbiedad para la cosecha de la biomasa así como en la etapa 1, los valores de turbiedad para un cultivo se encuentran en la Tabla 9. Al comparar estos valores con la Tabla 7, se puede concluir que para estas condiciones el tiempo de cultivo fue evidentemente mayor para las dos familias de microalgas.

Tabla 9. Monitoreo de turbiedad de un cultivo de las familias *Chlorella* y *Scenedesmus* en condiciones de estrés.

Especie Día	Turbiedad (NTU)	
	Scenedesmus	Chlorella
1	12	13,19
2	22,49	21,98
3	30,44	23,58
4	39,15	25,66
5	44,13	26,48
6	46,59	31,46
7	-	-
8	-	-
9	50,65	36,27
10	50,83	48,32
11	54,32	47,05
12	57,06	
13	60,12	
14	58,31	

(Nutrientes suministrados: 0,05 g/l; Bicarbonato suministrado: 0,07 g/l)

A continuación se muestran en la Tabla 10 los resultados de la extracción de lípido más clorofila en las dos etapas de cultivo para las familias de *Chlorella* y *Scenedesmus*.

Tabla 10. Porcentaje de lípido más clorofila en la primera y segunda etapa de cultivo con diferentes condiciones de cultivo para las familias *Chlorella* y *Scenedesmus*.

Etapas de cultivo	Familias de Microalgas	
	Chlorella lipido + clorofila (%)	Scenedesmus lipido+ clorofila (%)
1ra etapa	20,22	20,10
2da etapa	22,46	23,17

1ra etapa: 0,07g/l de bicarbonato; 0,1g/l de Nutrientes

2da etapa: 0,07g/l de bicarbonato; 0,05g/l de Nutrientes

Combinación de solventes usada para la extracción de lípido: cloroformo:metanol (1:2)

Se puede observar que los porcentajes en la segunda etapa de cultivo (condiciones de estrés) son mayores. Sin embargo, la diferencia respecto a las condiciones con un suministro normal de nutrientes no es significativa. Sería necesario realizar nuevas experimentaciones sometiendo a los cultivos a concentraciones de nutrientes mucho menores para lograr que la productividad de lípidos aumente significativamente.

4.3.4 Pretratamiento de disrupción celular

Se realizaron pretratamientos de biomasa algal con el fin de obtener una mayor productividad de lípido más clorofila. En la Tabla 11 se observan los resultados de pretratar la biomasa algal en el autoclave y en el liofilizador.

Tabla 11. Porcentajes de lípido más clorofila obtenido con pretratamientos de disrupción celular térmico y mecánico.

	Familia de Microalga
	Chorella
	Lipido + Chorofila (%)
Biomasa sin pretratar	20,22
*Biomasa con pretratamiento de disrupción celular térmico	20,46
Biomasa con pretratamiento de Liofilizacion	23,65

* Realizado con Autoclave por 30min (100°C y 100Mpa)

Condiciones del cultivo (1ra etapa) : 0,07g/l de bicarbonato; 0,1g/l de Nutrientes

Combinación de solventes usada para la extracción de lípido: cloroformo:metanol (1:2)

Se puede observar que el porcentaje de aumento de productividad cuando se sometió al autoclave fue prácticamente nulo debido a que sólo aumentó 0.24%. En fuentes bibliográficas revisadas se menciona que la biomasa algal debe permanecer en el autoclave en un tiempo óptimo de 1 a 3 horas. Por la gran energía que requiere el encendido del autoclave disponible en el laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería, la biomasa algal se autoclavó durante únicamente 30 minutos, resultando con el mínimo aumento en el porcentaje mostrado.

En cuanto a la Liofilización los resultados muestran un aumento del 3.43 % que no es eficiente debido a las grandes cantidades de energía que también son requeridas para este proceso representando un gasto energético innecesario.

Se requiere, sin embargo, analizar en forma cuantitativa la energía empleada en cada una de estas técnicas de disrupción celular para realizar una comparación del balance energético total resultante de la producción de lípidos bajo las condiciones experimentadas en la presente investigación.



CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- En el presente proyecto las microalgas fueron utilizadas como materia prima para la producción de biocombustibles ya que se perfilan como la fuente más adecuada debido a su rápido crecimiento, alto contenido de aceite y alta productividad (mayor que otras especies vegetales), capacidad de fijar CO₂, menores requerimientos de condiciones de cultivo y nutrientes y no compite por suelos ni con cultivos agrícolas.
- Para lograr el desarrollo de un proceso sustentable de producción de biodiesel a partir de microalgas se deben superar varios factores, el principal es el costo de producción de la biomasa, que involucra la optimización de medios, selección y manipulación de cepas y el diseño de fotobiorreactores. También se debe considerar el proceso de separación de biomasa y extracción de aceites.
- Debido a que, en el cultivo de microalgas confluyen varias condiciones ambientales tales como luz, agitación, aireación, oxígeno y fuentes de carbono y nutrientes, el control de estos parámetros es indispensable para lograr el crecimiento saludable de los cultivos.
- El método soxhlet demostró ser un método muy simple, fiable, eficaz y eficiente para la extracción de lípidos de la biomasa algal, sin embargo se recomienda contar con un protocolo de seguridad y el equipo de protección necesario para evitar quemaduras o inhalación de los solventes utilizados en la extracción.
- Con respecto a la determinación de la temperatura del equipo soxhlet, el indicador de temperatura en el nivel cinco, seis, siete y ocho después de una 1 h y 30min permaneció constante con un valor aproximado de 84°C por lo que se recomienda colocar el indicador de temperatura en el nivel 7



cuando se utilicen solventes con puntos de ebullición altos como el etanol. Si se utilizan solventes con puntos de ebullición bajos como la acetona y éter dietílico se recomienda un nivel tres o cuatro en el indicador de temperatura para la extracción del lípido algal.

- El rendimiento más alto de lípidos para las 5 familias de microalgas estudiadas fueron los siguientes: *Chlorella* obtuvo 20.37 % y *F.F. Especie 3* obtuvo 19.17% con la mezcla metanol:hexano (1:3), *Scenedesmus* obtuvo 20.10%, *F.F. Especie 1* obtuvo 17.69% y *H1* obtuvo 5.46%, con la mezcla cloroformo:metanol (1:2), de lípido más clorofila. Por esta razón se recomiendan estas dos mezclas como las más eficientes para la extracción de lípidos más clorofila. La combinación de solventes mejora la eficiencia del solvente que individualmente extraen un porcentaje menor de lípidos. Combinaciones mayores no se recomiendan debido a que son poco prácticas e incrementarían el costo de la producción del biodiesel principalmente a grandes escalas. La familia *Chlorella* es la que mayor productividad de lípidos posee a diferencia de la familia *H1* que produce un promedio de 4.19% de lípidos más clorofila para todas las combinaciones de solventes que se realizaron.
- Basado en el principio de extracción donde lo “semejante disuelve lo semejante” el alto porcentaje de lípido obtenido con la mezcla cloroformo:etanol (1:3) indicó que las familias *Chlorella* y *Scenedesmus* contienen cantidades de lípidos polares y neutros. El porcentaje de lípido extraído con éter dietílico fue de 5.38 % en la familia *Chlorella*, al ser éste un solvente no polar los lípidos obtenidos en su mayoría no fueron apolares.
- Se recomienda utilizar combinaciones binarias de solventes que contengan etanol ya que a más de arrojar resultados eficientes de porcentajes de lípidos más clorofila es de fácil accesibilidad y razonablemente barato en comparación con otros solventes.
- Debido a que no se contó con el equipo necesario para la cuantificación del



porcentaje de la clorofila dentro del lípido se recomienda para investigaciones posteriores la realización de esta cuantificación mediante espectroscopia UV, así como también identificar y cuantificar los lípidos presentes en la biomasa algal mediante un cromatógrafo.

- La productividad de biomasa y el contenido de lípidos, asociados directamente a la abundancia y escasez de nutrientes en el medio de cultivo respectivamente, son los factores esenciales del cultivo; sin embargo, estos factores son difíciles de lograr de forma simultánea; ya que en condiciones que favorecen una alta productividad de biomasa suele dar lugar a una baja acumulación de lípidos, y viceversa. Las dos etapas de cultivo que se utilizaron en este proyecto mostraron que una disminución del suministro de nutrientes representó una baja del 43.79 % en la productividad de biomasa algal; mientras que el contenido de lípido más clorofila fue únicamente 11% mayor al de la primera etapa. Se recomienda continuar con estas investigaciones utilizando más variaciones en el suministro de nutrientes al cultivo y, de ser posible, utilizar composiciones de nutrientes que permitan controlar por separado el suministro de nutrientes nitrogenados y fosforados.
- El pretratamiento térmico con autoclave, y físico mediante liofilización no mostraron un aumento considerable en el porcentaje de recuperación de lípidos respecto a la biomasa sin pretratar. La utilización de estos a escala de laboratorio representó un gasto energético innecesario. Además de esto el pretratamiento implica una pérdida de biomasa en el proceso de liofilización. Se recomienda sin embargo, continuar con estas investigaciones, determinando el consumo energético total del proceso de cultivo, cosecha y extracción de lípido para poder comparar cuantitativamente la viabilidad de utilizar microalgas como fuente energética especialmente cuando las microalgas han cumplido ya una función como agentes en el proceso de tratamiento de agua residual.



REFERENCIAS

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J Biol Sci*, 19(3), 257-275. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005
- Abou-Shanab, R. A. I., Hwang, J. H., Cho, Y., Min, B., & Jeon, B. H. (2011). Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. *Applied Energy*, 88(10), 3300-3306. doi: 10.1016/j.apenergy.2011.01.060
- Aldo de la Cruz Benítez¹, Benito Reyes Trejo¹, Diana Guerra Ramírez, & Ramírez¹, P. G. (2013). Composicion de esteres metilicos del biodiesel obtenido de semilla de Flamboyán.
- Alvarado, A. (2013). *Advanced dynamic modelling of wastewater treatment ponds*. (PhD), Ghent University, Belgium.
- Alvarado, A., Vedantam, S., Goethals, P., & Nopens, I. (2012). A compartmental model to describe hydraulics in a full-scale waste stabilization pond. *Water Res*, 46(2), 521-530. doi: 10.1016/j.watres.2011.11.038
- Amaro, H. M., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88(10), 3402-3410. doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.014
- Amaya, A., & Sarmiento, R. (2010). *Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas con etanolhexano empleando disrupción celular térmica y química*. Universidad Industrial de Santander.
- Araujo, G. S., Matos, L. J., Fernandes, J. O., Cartaxo, S. J., Goncalves, L. R., Fernandes, F. A., & Farias, W. R. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. *Ultrason Sonochem*, 20(1), 95-98. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.027
- Bošnjaković, M. (2013). Biodiesel from algae. *Mechanics Engineering and Automation*.
- Boudghene Stambouli, A., & Traversa, E. (2002). Fuel cells, an alternative to standrd soucers of energy. *Renewable y Sustainable Energy Reviews*, 6, 297-306.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.009
- Cabrera, A., & Pulla, M. F. (2014). Linea base para el aprovechamiento de microalgas de tratamiento de agua residual.
- Craggs, R. J., Sukias, J. P., Tanner, C. T., & Davies-Colley, R. J. (2004). Advanced pond system for dairy-farm effluent treatment. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 47(4), 449-460. doi:



- 10.1080/00288233.2004.9513613
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*, 25(3), 294-306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*, 26(3), 126-131. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.12.002
- Díez Bellido, C. (2013). *Obtención de Bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con Pichia stipitis*. Universidad de Valladolid
- Dragone, G. D., Fernandes, B. F., Vicente, A., & Texeira, J. A. (2010). Third generation biofuels from microalgae
- Dufey, A. (2006). *Biofuels Production, Trade and Sustainable Development: Emerging Issues*. (IIED Ed. ilustrada ed.).
- Durazno, G. (2009). Resultados de la Evaluación de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (Periodo: Noviembre de 1999 - Diciembre del 2009) *Dirección Técnica de Agua Potable y Alcantarillado, Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba* (pp. 294). Cuenca, Ecuador: ETAPA.
- Fernández, C., Montiel, J., Milán, A., & Badillo, J. (2012). Producción de Biocombustible a partir de algas. *Ra Ximhai*, 8, 101-115.
- 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
- Galindo, D., & Gonzáles, S. (2010). *Adaptación del Método Bligh y Dier a la Extracción de lípidos de microalgas nativas para la producción de Biodiesel*. Universidad Industrial de Santander.
- Garibay, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez, M. d. P., Serrano, L., & Martínez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas 13.
- Gendy, T. S., & El-Temtamy, S. A. (2013). Commercialization potential aspects of microalgae for biofuel production: An overview. *Egyptian Journal of Petroleum*, 22(1), 43-51. doi: 10.1016/j.ejpe.2012.07.001
- Glembin, P., Kerner, M., & Smirnova, I. (2013). Cloud point extraction of microalgae cultures. *Separation and Purification Technology*, 103, 21-27. doi: 10.1016/j.seppur.2012.10.017
- González, I. A. D., Kafarov, D. V., & Monsalve, D. A. G. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. 53-60.
- Hackenberg, N. (2008). Biocombustibles de Segunda Generación.
- 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
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., & Danquah, M. K. (2010). Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering



- Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*, 2010, 1-11. doi: 10.1155/2010/391632
- Janssens, N. (2010). *Characterization of algal diversity and kinetics in Waste Stalization Ponds*. Ghent University.
- Jonker, J. G. G., & Faaij, A. P. C. (2013). Techno-economic assessment of micro-algae as feedstock for renewable bio-energy production. *Applied Energy*, 102, 461-475. doi: 10.1016/j.apenergy.2012.07.053
- Kennedy, D. (2009). *Alternative Sources of Energy* Croatia.
- Koizumi, T. (2014). *Biofuels and Food Security : Biofuel Impact on Food Security in Brazil, Asia and Major Producing Countries*. (I. Springer Ed.).
- Korres, N., O'Kiely, P., Benzie, J. A. H., & West, J. S. (2013). *Bioenergy Production by Anearobic Digestion: Using Agricultural Biomass and Organic Wastes*: Taylor & Francis.
- Mara, D. (2004). *Domestic Wastewater Treatment in Developing Countries*. London: Earthscan.
- Mara, D. (2009). Waste stabilization ponds Past, present and future. *Desalination and Water Treatment*, 4, 85-89.
- Martínez-Alcalá, Á. *Producción de bioetanol mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam explosion*. Universidad Complutense de Madrid.
- Morais, M. G. d., & Costa, J. A. V. (2007). Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management*, 48(7), 2169-2173. doi: 10.1016/j.enconman.2006.12.011
- Mosquera Martínez, M. J., & Merino Ruesga, L. (2006). *Empresa y energías renovables: lo que su empresa debe saber sobre energías renovables, eficiencia energética y Kioto*: Fundación Confemetal.
- Park, J. B., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour Technol*, 102(1), 35-42. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.158
- Park, J. B., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2013). Enhancing biomass energy yield from pilot-scale high rate algal ponds with recycling. *Water Res*, 47(13), 4422-4432. doi: 10.1016/j.watres.2013.04.001
- Peñarranda, M., Martinez Roldan, A., & Villanueva, R. (2013). Biodiesel Production from Microalgae: Cultivation Parameters that Affect Lipid Production. 43-68.
- Perez, M. (Ed.). (2008). *Energia Sostenible: Antologia de Lecturas del Instituto Tropical de Energia, Ambiente y Sociedad (ITEAS)*.
- Quin, J. (2005). Bio Hydrocarbons from Algae Impacts of temperature, light and salinity on algae growth. Barton, Australia Rural Industries Research and Development Corporation.
- 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

- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*.
- Ruiz, A. (2011). *Puesta en marcha de un Cultivo de Microalgas para la eliminación de nutrientes de un Agua Residual Urbana previamente tratada anaeróbicamente*. (Master.), Universidad Politécnica de Valencia.
- Sandoval, P. (2010). *La Eficiencia Energetica en Edificios. La Nueva Directiva Comunitaria*.
- Sathish, A. (2012). *Biodiesel Production from Mixed Culture Algae Via a Wet Lipid Extraction Procedure*. (Master of Science (MS) in Biological Engineering), Utah State University. Retrieved from <http://digitalcommons.usu.edu/etd/1372>
- Sperling, V. (2007a). *Biological Wastewater Treatment Series: Waste Stabilisation Ponds*. IWA Publishing.
- Sutherland, D. L., Turnbull, M. H., & Craggs, R. J. (2014). Increased pond depth improves algal productivity and nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds. *Water Res*, 53, 271-281. doi: 10.1016/j.watres.2014.01.025
- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A. H., Haik, Y., & Farid, M. (2014). Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel. *Biomass and Bioenergy*, 1-9. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.02.034
- Weldy, C., & Huesemann, M. (2007). Lipid production by *dunaliella salina* in batch culture effects of nitrogen limitation and light intensity *Journal of Undergraduate. Department of Energy Journal of Undergraduate Research*.
- Zhang, Y. (2003). Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresour Technol*, 89(1), 1-16. doi: 10.1016/s0960-8524(03)00040-3



ANEXOS

Anexo 1. Control de Carbonato, Nutrientes y pH de la familia Chlorella.

[illegible]

REALIZADO POR: M^{ra} José Pérez | Jenny Quishpi

4002

[illegible]

LABORATORIO DE SANITARIA
FACULTAD INGENIERIA CIVIL



Fundada en 1867
UNIVERSIDAD DE CUENCA

[illegible]

Colt no # 0 1 1 2

REALIZADO POR: Maria José Pérez, Jenny Quishpi

REALIZADO POR: Maria José Pérez, Jenny Quishpi

Especie: F F Especie 3 a. (balón)

[illegible]

REALIZADO POR: María José Pérez, Jenny Quishpi

二

[illegible]

REALIZADO POR: María José Pérez, Jenny Quishpi

Especie: F. F. Especie 3 (fiasco)

[illegible]

CONTROL DE CRECIMIENTO	
REALIZADO POR: <u>María José Pérez, Jenny Quishpi</u>	

Especie: Chorella 1 (frasco grande)

FECHA	HORA	COMIDA				PH	OBSERVACIONES
		Bicarbonato	NPK	Carbonato	Volumen		
Lun 22/09	17:34	0,1475	0,3248	-	3,5 l	-	Cosecha
Lun 29/09	10:44	0,1432	0,3248	-	3,5 l	-	Cosecha
Lun 06/10	10:00	0,1466	0,3234	-	3,5 l	-	Bic = 0,0449 NPK = 0,0923 Cosecha
Mar 07/10	18:00	-	-	-	3,5 l	11,1	4mic CO ₂ → PH=8
Lun 13/10	10:42	0,1475	0,3240	-	3,5 l	8,755	Cosecha
Mar 14/10	14:03	-	-	-	-	10,151	Ad CO ₂
Mier 15/10	16:55	-	-	-	-	10,484	1min CO ₂ → PH=8
Jue 16/10	12:20	-	-	-	-	10,457	-
Vie 17/10	10:43	-	-	-	-	10,642	1min CO ₂ → PH=8,5
Vie 17/10	18:00	-	-	-	-	10,681	Se acabo el CO ₂ .
Lun 20/10	r	0,1254	0,3544	-	3,5 l	-	Cosecha y Cultivo con Chacilla de Respiri
Lun 27/10	09:50	0,1260	0,3568	-	3,5 l	-	Cosecha y Cultivo.
Mar 07/11	11:00	0,2193	0,3550	-	3,5 l	-	Cosecha y Cultivo
			0	-	0	-	-
	F.F.	Especie # 3					
Lun 10/11	10:36						Nuevo Cultivo como inoculo se usa
							F.F especie- 3 de fresco 1.5l
							se requiere tener mayor biomasa
							de esta especie para las siguientes extracciones.
Jue 12/11		0,2332	0,3625	-	3,5 l	-	Cosecha y cultivo
Jue 20/11		0,2385	0,3653	-	3,5 l	-	Cosecha y cultivo

María José Pérez
Jenny Quishpi

CONTROL DE CRECIMIENTO	
REALIZADO POR: <u>María José Pérez, Jenny Quishpi</u>	

Especie: FF. Especie 1 (fiasco grande)

[illegible]

Anexo 3. Porcentajes de lípidos más clorofila y tiempos de extracción de las familias de microalgas.

FAMILIA CHORELLA

Chlorella									
No mezclas	Mezclas		Relacion			% de lipido +clorofila	Promedio (%)	Tiempo de extracción (H:mm)	Promedio del Tiempo de Extraccion (%)
1	Cloroformo	Metanol	1	:	2	23,65	20,22	7:20	6:19
						22,15		7:02	
						15,45		7:15	
						19,03		7:29	
						20,81		2:31	
2	metanol	Hexano	1	:	3	21,30	20,37	3:10	3:06
						19,43		3:03	
3	Etanol	-	1	:	-	16,93	18,29	5:05	6:02
						19,65		7:00	
4	Cloroformo	Etanol	1	:	3	16,38	16,89	2:50	2:47
						17,41		2:45	
5	Etanol	Hexano	1	:	3	14,79	15,09	9:13	8:22
						15,38		7:32	
6	Cloroformo	Etanol	1	:	1	13,88	14,99	7:21	8:04
						15,94		9:45	
						15,14		7:08	
7	Cloroformo	-	1	:	-	10,98	11,42	5:09	5:00
						11,86		4:51	
8	Eter Dietilico	Etanol	1	:	1	11,17	11,17	6:34	6:34
9	Cloroformo	Hexano	1	:	2	7,38	7,19	6:50	6:11
						7,01		5:33	
10	Hexano	-	1	:	-	5,22	5,60	7:05	4:30
						4,97		3:10	
						6,62		3:15	
11	Eter Dietilico	-	1	:	-	5,38	5,38	3:01	3:01
12	Hexano	Acetona	1	:	1	5,14	5,14	12:26	12:26

Chlorella					
No	Mezclas	% de lipido +clorofila	Desviación Estandar	Número de Muestras	Error estándar
1	Cloroformo: Metanol (1:2)	20,22	3,16	5	1,42
2	Metanol:Hexano (1:3)	20,37	1,32	2	0,93
3	Etanol	18,29	1,93	2	1,36
4	Cloroformo:Etanol (1:3)	16,89	1,93	2	1,36
5	Etanol:Hexano (1:3)	15,09	0,73	2	0,52
6	Cloroformo:Etanol (1:1)	14,99	1,04	3	0,60
7	Cloroformo	11,42	0,62	2	0,44
8	Eter Dietilico:etanol (1:1)	11,17	-	1	-
9	Cloroformo:Hexano (1:2)	7,19	0,26	2	0,18
10	Hexano	5,60	0,89	2	0,63
11	Eter Dietilico	5,38	-	1	-
12	Hexano:Acetona (1:1)	5,14	-	1	-

FAMILIA SCENEDESMUS

Scenedesmus									
No mezclas	Mezclas		Relacion			% de lipido +clorofila	Promedio (%)	Tiempo de extracción (H:mm)	Promedio del Tiempo de Extraccion (H:mm)
1	Cloroformo	Metanol	1	:	2	16,68	20,10	9:09	7:59
						21,27		11:26	
						20,32		4:20	
						22,15		7:02	
2	metanol	Hexano	1	:	3	18,59	17,95	3:00	3:22
						17,31		3:45	
3	Etanol	-	1	:	-	18,34	16,86	6:20	4:47
						15,38		3:15	
4	Cloroformo	Etanol	1	:	3	19,14	17,59	4:00	3:10
						16,05		2:20	
5	Etanol	Hexano	1	:	3	15,04	14,75	5:20	5:20
						14,47		5:20	
6	Cloroformo	Etanol	1	:	1	16,72	16,06	5:20	5:20
						15,40		5:20	
7	Cloroformo	-	1	:	-	12,75	12,75	6:17	6:17
8	Cloroformo	hexano	1	:	2	9,73	10,19	5:20	5:20
						10,66		5:20	
9	hexano	-	1		-	7,04	7,04	5:05	5:05
10	hexano	acetona	1	:	1	13,11	13,11	5:06	5:06



Scenedesmus					
No	Mezclas	% de lipido +clorofila	Desviación Estandar	Número de Muestreos	Error estándar
1	Cloroformo: Metanol (1:2)	20,10	2,40	4	1,20
2	Metanol:Hexano (1:3)	17,95	0,91	2	0,64
3	Etanol	16,86	2,10	2	1,48
4	Cloroformo:Etanol (1:3)	17,59	2,18	2	1,54
5	Etanol:Hexano (1:3)	14,75	0,41	2	0,29
6	Cloroformo:Etanol (1:1)	16,06	0,94	2	0,66
7	Cloroformo	12,75	0,94	1	0,94
8	Cloroformo:hexano (1:2)	10,19	0,66	2	0,47
9	Hexano	7,04	-	1	-
10	Hexano:Acetona (1:1)	13,11	-	1	-

FAMILIA F.F. ESPECIE 1

F.F. Especie 1									
No mezclas	Mezclas		Relacion			% de lipido +clorofila	Promedio (%)	Tiempo de extracción (H:mm)	Promedio del Tiempo de Extraccion (H:mm)
1	Cloroformo	Metanol	1	:	2	17,39	17,69	5:11	3:50
						17,98		2:30	
2	metanol	Hexano	1	:	3	15,62	13,96	4:20	4:18
						12,31		4:16	
3	Etanol	-	1	:	-	10,41	9,225	2:46	2:48
						8,04		2:50	
4	Cloroformo	Etanol	1	:	3	5,32	5,765	2:15	2:22
						6,21		2:30	

F.F. Especie 1					
No	Mezclas	% de lipido +clorofila	Desviación estándar	Número de Muestreos	Error estándar
1	Cloroformo: Metanol (1:2)	17,69	0,42	2	0,30
2	Metanol:Hexano (1:3)	13,96	2,34	2	1,65
3	Etanol	9,23	1,68	2	1,19
4	Cloroformo:Etanol (1:3)	5,77	0,63	2	0,44



FAMILIA F.F. ESPECIE 3

F.F Especie 3									
No mezclas	Mezclas		Relacion			% de lipido +clorofila	Promedio (%)	Tiempo de extracción (H:mm)	Promedio del Tiempo de Extraccion (H:mm)
1	Cloroformo	Metanol	1	:	2	14,77	18,31	7:15	5:15
						21,85		3:15	
2	metanol	Hexano	1	:	3	20,36	19,17	3:25	3:17
						17,98		3:10	
3	Etanol	-	1	:	-	15,60	13,53	6:30	4:45
						11,46		3:00	
4	Cloroformo	Etanol	1	:	3	15,37	12,69	5:15	4:00
						10,01		2:45	

F.F. Especie 3					
No	Mezclas	% de lipido +clorofila	Desviación Estandar	Número de Muestreos	Error estándar
1	Cloroformo: Metanol (1:2)	18,31	5,00	2	3,54
2	Metanol:Hexano (1:3)	19,17	1,68	2	1,19
3	Etanol	13,53	2,93	2	2,07
4	Cloroformo:Etanol (1:3)	12,69	3,79	2	2,68



FAMILIA H1

H1									
No mezclas	Mezclas		Relacion			% de lipido +clorofila	Promedio (%)	Tiempo de extracción (H:mm)	Promedio del Tiempo de Extraccion (H:mm)
1	Cloroformo	Metanol	1	:	2	6,36	5,46	2:15	2:29
						4,56		2:44	
2	metanol	Hexano	1	:	3	4,91	4,49	7:00	5:37
						4,06		4:15	
3	Etanol	-	1	:	-	3,70	3,91	2:54	2:24
						4,11		1:55	
4	Cloroformo	Etanol	1	:	3	2,79	2,92	1:45	2:02
						3,06		2:20	

H1					
No	Mezclas	% de lipido +clorofila	Desviación estándar	Numero de Muestreos	Error estándar
1	Cloroformo: Metanol (1:2)	5,46	1,27	2	0,90
2	Metanol:Hexano (1:3)	4,49	0,60	2	0,43
3	Etanol	3,91	0,29	2	0,20
4	Cloroformo:Etanol (1:3)	2,92	0,19	2	0,14

Anexo 4. Datos registrados durante las extracciones de lípido algal con el equipo Soxhlet.

LABORATORIO DE SANITARIA
FACULTAD INGENIERIA CIVIL

Fundada en 1867
UNIVERSIDAD DE CUENCA

PROYECTO: Evaluación comparativa de la producción de biodiesel de lagunas de tratamiento de A.R.									
ENSAYO REALIZADO POR: María José Pérez, Jenny Quishpi									
FECHA: Lunes 22 de septiembre de 2014									
EXTRACCIÓN SOXHLET									
Balón No			M-C						
Ensayo No	9		10	11					
Especie de Alga	Chlorella		Chlorella	Especie # 3					
	Liofilizada		Liofilizada	Liofilizada					
Pesos Iniciales									
Peso del Cartucho de Extracción (gr.)	3.1930		3.2554	3.2357					
Peso de muestra (gr.)	2.5465		2.7619	2.2543					
Peso cartucho+algodón+muestra(alga): (gr.)	5.9783		6.3195	5.1806					
Peso Balón de Ebullición (vacío): (gr.)	172.5526		177.1557	176.8480					
Volumen de Solventes (ml)									
Recuperado (ml)			150	150					
	Eterol (1)	Clorof. (1)	Eterol (2)	Clorof. (2)	MeL (2)	Clorof. (1)			
	75	75	-	-	-	-			
Ejecución del Ensayo									
Indicador de temperatura Soxhlet	5	5	5	5					
Hora de Inicio (H:min)	11:40		11:40	11:40					
Hora final (H:min)	19:01		17:56	18:55					
Tiempo de extracción (H:min)	7:21		6:16	7:15					
# de ciclos (sifonadas)	9		10	8					
Pesos secos al finalizar el ensayo									
Balón de Ebullición+lípido algal (gr.)	172.9059		-	177.1806					
Cartucho+algodón+residuo algal (gr.)	5.6607		5.8500	5.2878					
Resultados del ensayo									
% de Lípido obtenido	13.88		-	14.77					
Peso de lípido de alga obtenido (gr.)	0.3533		-	0.3326					
Peso de residuo de alga en el cartucho (gr.)	2.2279		-	1.7285					
Volumen de Solvente recuperado (gr.)	120		130	120					
Observaciones: El ensayo #10 no se concluyó debido al ingreso de agua en el balón de ebullición									

LABORATORIO DE SANITARIA
FACULTAD INGENIERIA CIVIL

Fundada en 1867
UNIVERSIDAD DE CUENCA

PROYECTO: *Evaluación cuantitativa de la producción de biodiesel de lagunas de tratamiento de A.R.*

ENSAYO REALIZADO POR: *M^a José Pérez, Jenny Quishpi*

FECHA: *24/10/2014*

EXTRACCIÓN SOXHLET									
Balón No									
Ensayo No		18		19		20		21	
Especie de Alga		Chorella		Chorella		Chorella		Chorella	
		Chlorococcum		Chlorococcum		Chlorococcum		Chlorococcum	
Pesos Iniciales									
Peso del Cartucho de Extracción	(gr)	3,2060		3,3038		3,4562		3,4915	
Peso de muestra	(gr)	4,2431		4,3543		4,2454		4,2510	
Peso cartucho+algodón+muestra(alga):	(gr)	4,7488		5,0060		5,0013		4,7805	
Peso Balón de Ebullición (vacío):	(gr)	172,5457		177,1648		181,3476		175,8137	
Volumen de Solventes (ml)									
Recuperado		—		—		—		—	
		Cloroformo		Clorof		Hexano		Hexa	
		250		250		250		250	
Ejecución del Ensayo									
Indicador de temperatura Soxhlet		7		7		7		7	
Hora de Inicio	H - mm	09:50		09:50		09:50		09:50	
Hora final	H - mm	14:59		14:41		13:00		13:05	
Tiempo de extracción	H - mm	5:09		4:51		3:10		3:15	
# de ciclos (sifonadas)		28		29		28		27	
Pesos secos al finalizar el ensayo									
Balón de Ebullición+lípido algal	(gr)	172,6822		177,3254		181,4095		175,8966	
Cartucho+algodón+residuo algal	(gr)	4,6750		4,9058		5,0953		4,7653	
Resultados del ensayo									
% de Lípido obtenido	%	10,9890		11,86		11,97		6,63	
Peso de lípido de alga obtenido	(gr)	0,1365		0,1606		0,0619		0,0829	
Peso de residuo de alga en el cartucho	(gr)	4,1693		4,2591		4,3394		4,2358	
Volumen de Solvente recuperado	(ml)	180		190		180		180	
Observaciones:									

LABORATORIO DE SANITARIA
FACULTAD INGENIERIA CIVIL



Fundada en 1867

UNIVERSIDAD DE CUENCA

PROYECTO: Evaluación cuantitativa de la producción de biodiesel de lagunas de tratamiento de A.R.														
ENSAYO REALIZADO POR: María José Pérez, Jenny Quishpi														
FECHA: 30/10/2014														
EXTRACCIÓN SOXHLET														
Balón No	1	2	3	4	5	17								
Ensayo No	(22)	(23)	(24)	(25)	26	27								
Especie de Alga	Scenedesmus	Scenedesmus	Scenedesmus	Scenedesmus	Scenedesmus	Scenedesmus								
	triturada	triturada	triturada											
Pesos Iniciales														
Peso del Cartucho de Extracción (gr)	3,1717	3,2158	3,1503	3,1973	3,2390	3,3056								
Peso de muestra (gr)	4,2419	4,1999	4,2064	4,2025	4,2027	4,1498								
Peso cartucho+algodón+muestra(alga): (gr)	4,8327	4,6423	4,7966	4,7883	4,9338	4,9264								
Peso Balón de Ebullición (vacío): (gr)	172,5443	175,816	181,3346	175,8333	177,1539	176,8483								
Volumen de Solventes (ml)														
Recuperado														
Solvente	Cloro (1)	Hexano (2)	Cloro (1)	Hexano (2)	Cloro (1)	Hexano (2)								
Cantidad	50	100	50	100	50	100								
Ejecución del Ensayo														
Indicador de temperatura Soxhlet	7	7	7	7	7	7								
Hora de Inicio (H: mm)	09:20	09:20	09:20	09:20	09:20	09:20								
Hora final (H: mm)	14:40	14:40	14:40	14:40	14:40	14:40								
Tiempo de extracción (H: mm)	5:20	5:20	5:20	5:20	5:20	5:20								
# de ciclos (sifonadas)	45	45	49	24	45	44								
Pesos secos al finalizar el ensayo														
Balón de Ebullición+lípido algal	172,6622	175,9439	181,5363	176,0186	177,3348	177,0219								
Cartucho+algodón+residuo algal	4,7336	4,5297	4,6003	4,5951	4,7838	4,7499								
Resultados del ensayo														
% de Lípido obtenido	9,73	10,66	16,72	15,40	15,04	14,47								
Peso de lípido de alga obtenido (gr)	0,4479	0,4279	0,2017	0,4053	0,4809	0,4736								
Peso de residuo de alga en el cartucho (gr)	1,1128	1,0873	1,0101	1,0103	1,0527	1,0533								
Volumen de Solvente recuperado (ml)	120	115	140	135	170	150								
Observaciones:														

LABORATORIO DE SANITARIA
FACULTAD INGENIERIA CIVIL

Fundada en 1867
UNIVERSIDAD DE CUENCA

PROYECTO: Evaluación Cuantitativa de la producción de biodiesel de laguna de Tablamiento de
ENSAYO REALIZADO POR: María José Pérez, Jenny Quishpi
FECHA: 30/10/2014

EXTRACCIÓN SOXHLET

Balón No	1	2	3	4	6	5
Ensayo No	28	29	30	31	32	33
Especie de Alga	Senedesmus TR	Senedesmus TR	Senedesmus TR	Chorella TR	Chorella TR	Chorella TR
Pesos Iniciales						
Peso del Cartucho de Extracción (gr)	3,4385	3,1827	3,3232	3,1537	3,2114	3,3210
Peso de muestra (gr)	4,5004	4,5016	4,5227	4,4991	4,4993	4,5181
Peso cartucho+algodón+muestra(alga): (gr)	5,2474	5,1546	5,1736	5,2144	5,2144	5,5523
Peso Balón de Ebullición (vacío): (gr)	472,5462	475,8197	484,3494	475,8337	476,8547	477,4657
Volumen de Solventes ml						
Recuperado	90 ml	200 ml				Hexano: 150
	Hexa : Acetona 50 ml: 50 ml	Hexano —	Cloroformo —	Eter Dietílico 200	Eter A: Etan (4:4) 100 100	Meta: Hexan (1:3) 50 : —
Ejecución del Ensayo						
Indicador de temperatura Soxhlet (H: mm)	7	7	7	6	7	7
Hora de Inicio (H: mm)	09:15	09:15	09:15	09:15	09:15	09:15
Hora final (H: mm)	14:21	14:20	15:32	12:16	15:49	12:18
Tiempo de extracción (H: mm)	5:06	5:05	6:17	3:01	6:34	3:03
# de ciclos (sifonadas)						
Pesos secos al finalizar el ensayo						
Balón de Ebullición+lípido algal (gr)	172,7428	175,9254	181,5432	175,9144	177,0222	177,4603
Cartucho+algodón+residuo algal (gr)	5,0847	5,0348	5,4093	5,0977	5,0419	5,2826
Resultados del ensayo						
% de Lípido obtenido	13,11	7,04	12,75	5,38	41,17	19,43
Peso de lípido de alga obtenido (gr)	0,1966	0,1057	0,1941	0,10807	0,1675	0,12931
Peso de residuo de alga en el cartucho (gr)	1,3374	1,3818	3,3445	1,1732	1,3268	1,2484
Volumen de Solvente recuperado (ml)	125	445	170	50	70	150
Observaciones:						

LABORATORIO DE SANITARIA
FACULTAD INGENIERIA CIVIL

Fundada en 1867
UNIVERSIDAD DE CUENCA

PROYECTO: Evaluación cuantitativa de la producción de biodiesel de leguminas de Graminosa de AR

ENSAYO REALIZADO POR: Ma José Pérez, Jenny Quishpi

FECHA: 07/11/2014

EXTRACCIÓN SOXHLET									
	1	2	3	4	5	6			
Balón No	34	35	36	37	38	39			
Ensayo No									
Especie de Alga	Chorella	Chorella	Chorella	Scenedesmus	Especie A	Especie A			
	trit	trit	trit	trit	trit	trit			
Pesos Iniciales									
Peso del Cartucho de Extracción (gr)	3.3853	3.2351	3.2132	3.2777	3.2898	3.2659			
Peso de muestra (gr)	1.2857	1.3177	1.4337	0.7692	1.1260	1.1437			
Peso cartucho+algodón+muestra(alga): (gr)	4.9635	4.8318	4.9360	4.4314	4.8580	4.8495			
Peso Balón de Ebullición (vacío): (gr)	172.5449	175.8472	184.3490	175.8349	177.1649	176.8542			
Volumen de Solventes (ml)									
Recuperado	200	—	—	30	—	—			
	Meta(2): Clor(1)	Euro(2): Clor(1)	Etolol	Meta(2): Clor(1)	Meta(2): Clor(1)	Meta(1): Hex(2)			
	—	150 50	150	120 60	120 60	50 150			
Ejecución del Ensayo									
Indicador de temperatura Soxhlet	7	7	7	7	7	7			
Hora de Inicio	08:40	08:40	08:40	08:40	08:40	08:40			
Hora final	11:11	11:30	13:45	13:00	13:51	13:00			
Tiempo de extracción	2:31	2:50	5:05	4:20	5:11	4:20			
# de ciclos (sifonadas)									
Pesos secos al finalizar el ensayo									
Balón de Ebullición+lípido algal	172.8124	176.0320	181.5947	175.9882	177.3607	177.0328			
Cartucho+algodón+residuo algal	4.8606	4.7132	4.8070	4.0043	4.7679	4.7694			
Resultados del ensayo									
% de Lípido obtenido	20.81	16.58	16.93	20.32	17.39	15.62			
Peso de lípido de alga obtenido (gr)	0.2675	0.2158	0.2427	0.1563	0.1958	0.1786			
Peso de residuo de alga en el cartucho (gr)	1.1828	1.1991	1.3047	0.3421	1.0359	1.0636			
Volumen de Solvente recuperado (ml)	160	160	100	120	120	170			
Observaciones:									

PROYECTO: Evaluación Cuantitativa de la producción de biodiesel de lagunas de tratamiento de A.R

ENSAYO REALIZADO POR: María José Pérez, Jenny Quishpi

FECHA: 12/11/2014

Balón No	1	2	3	4	5	6
Ensayo No	40	41	41	43	44	45
Especie de Alga	Chlorella	Chlorella	Sc	Espe #3	Espe #3	H4

Pesos Iniciales

Peso del Cartucho de Extracción (gr):	3.2918	3.1864	3.3108	3.2464	3.0567	2.9554
Peso de muestra (gr):	1.0043	1.0576	1.3745	1.1593	1.1670	1.1594
Peso cartucho+algodón+muestra(alga) (gr):	4.6627	4.6698	5.2443	4.7485	4.6620	4.7841
Peso Balón de Ebullición (vacío) (gr):	172.15340	175.8031	181.3369	175.8210	177.1499	176.8394

Volumen de Solventes (ml)

Recuperado	200	160	75	200	200
Meta (1)	Hexan(3)	Cloro(4)	Hex (3)	Met (4)	Clor (1)
50a	—	—	225	75	225
Meta (2)	Cloro(2)	Hex (3)	Met (4)	Clor (1)	Meta (2)
—	—	225	75	—	—

Ejecución del Ensayo

Indicador de temperatura Soxhlet	8	8	8	8	8	8
Temperatura con Termómetro Infrarojo (C)	54.8	66.3	77.7	69.3	58.3	58.1
Hora de Inicio (H:mm)	08:30	08:30	08:30	08:30	08:30	08:30
Hora final (H:mm)	11:40	11:15	11:30	11:55	11:45	10:45
Tiempo de extracción (H:mm)	3:10	2:45	3:00	3:25	3:15	2:15
# de ciclos (sifonadas)						

Pesos secos al finalizar el ensayo

Balón de Ebullición+lípido algal (gr)	172.7479	175.9872	181.5924	176.0570	177.14049	176.9134
Cartucho+algodón+residuo algal (gr)	4.4566	4.4603	5.0012	4.5232	4.4560	4.3564

Resultados del ensayo

Lípido obtenido (%)	21.30	17.41	18.5990	20.3670	21.85	6.36
Peso de lípido de alga obtenido (gr)	0.2129	0.1841	0.2555	0.236	0.255	0.1791
Peso de residuo de algal en el cartucho (gr)		1.1				
Volumen de Solvente recuperado (ml)	75	130	125	125	175	175

Observaciones: Se consumió la cantidad de solvente de la mezcla: Met:Hex(1:3) y no se dieron los ciclos y se añadió 10ml adicionales al balón 1. Se debe tener cuidado con esta mezcla ya que se lea en el