

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**



FACULTAD DE INGENIERIAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA”**

Realizado por:

ALISSON SELENA VEGA AYALA

Director del proyecto:

PhD (c) Johanna Medrano Barboza

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 7 de octubre de 2022

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

DECLARATORIA JURAMENTADA

Yo, ALISSON SELENA VEGA AYALA, con cédula de identidad # 1725994402, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo.



FIRMA

1725994402

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA”**

Realizado por:

ALISSON SELENA VEGA AYALA

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JOHANNA LUCÍA MEDRANO BARBOZA

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Medrano Barboza', is centered on the page. The signature is fluid and cursive, with a large initial 'J' and 'M'.

FIRMA

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

PhD. ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

PhD (c) SUSANA ELIZABETH CHAMORRO ARIAS

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador

FIRMA

FIRMA

Quito, 7 de octubre de 2022

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del Programa de Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

Energías, Ambiente y Biotecnología

Perteneciente a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios y a la Virgen María por darme la fuerza necesaria para cumplir con esta meta; cada palabra de este escrito es para su mayor gloria y honor.

A mis padres Diego Vega y Marcia Ayala por estar siempre pendientes de mí y apoyarme no solo en lo económico sino también en lo afectivo con todo su cariño; a Paula Vega y Juan Diego Vega, mis hermanos que en todo momento me acompañan con sus bromas y risas; a Cristhian Jaramillo por ser mi compañero en todas las aventuras de esta tesis y por su cariño al estar pendiente de todo lo que necesito en cada instante. A mis compañeros de laboratorio Thais Flor, Samuel Arroyo, Francis Espinosa, Luis Guasumba por toda su ayuda y respaldo con mi tesis. A mi familia espiritual por siempre cobijarme con sus oraciones y a Santa Gemma Galgani por interceder por mí.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a la profesora Johanna Medrano, por su guía, su tiempo y su acogida en todo momento, por compartirme sus conocimientos, experiencias y consejos y por todo el cariño que me transmitió con la ciencia. A los profesores Susana Chamorro y Alberto Aguirre por todo el tiempo invertido en acompañarme y guiarme en los estudios.

A la Universidad por brindarme todas las posibilidades para crecer en mi vida profesional y fomentar el cariño a mi profesión.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Para someter a:

To be submitted:

**Alisson Selena Vega Ayala¹, Johanna Medrano Barboza^{1*}, Alberto Alejandro Aguirre
Bravo¹, Susana Elizabeth Chamorro Arias¹**

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA”**

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

7 de octubre de 2022

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: PhD (c) Johanna Medrano Barboza,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

Teléfono: 0969094576; email: johanna.medrano@uisek.edu.ec

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

RESUMEN

Las piscinas acuícolas presentan en su composición, restos de alimentos artificiales suministrados a las especies y ciertos productos químicos que, en conjunto, producen altas concentraciones de nutrientes y sólidos disueltos en este tipo de agua residual. El agua residual de origen acuícola contiene una carga orgánica capaz de proveer condiciones favorables para el cultivo de microalgas como *Chlorella vulgaris*, garantizando la biofijación del CO₂, la producción de biomasa y biocombustibles de tercera generación como alternativa prometedora de una nueva fuente de energía. En la presente investigación se determinó el rendimiento de lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual acuícola con fines de producción de biocombustibles líquidos a través de la caracterización del agua residual obtenida en el sector de Nanegalito – Ecuador. Se analizó el crecimiento celular en términos de densidad óptica, conteo celular y peso seco, obteniendo 0.47 g/L de biomasa con una productividad específica de 0.083 d⁻¹. Se determinaron los parámetros fisicoquímicos del agua obteniendo una remoción de 93.43% de carbono orgánico total (COT), 96.34% de nitrógeno total (NT) y 92.19% de fósforo total (PT). Se registró una producción de lípidos de 23.01% con la mezcla cloroformo: metanol (1:2), una producción de ácidos grasos libres (AGL) del 46.41% con cloroformo: metanol (1:2) y un porcentaje del 88.9% de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME-por sus siglas en inglés), con ayuda del ácido sulfúrico como catalizador de la reacción de transesterificación. Este trabajo demuestra la funcionalidad del agua residual de origen acuícola para la producción de lípidos a partir de biomasa microalgal de *C. vulgaris*, pero no para la obtención de AGL y FAME de forma eficiente.

Palabras claves: *Chlorella vulgaris*, agua residual acuícola, remoción de nutrientes, lípidos.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

ABSTRACT

Aquaculture pools present in their composition, remains of artificial food supplied to the species and certain chemical products that produce high concentrations of nutrients and dissolved solids in this type of wastewater. Aquaculture wastewater contains an organic load capable of providing favorable conditions for the cultivation microalgae like *Chlorella vulgaris*, ensuring CO₂ biofixation, biomass production and the possibility of third generation biofuel as a promising alternative for a new energy source. In the present research, the lipid yield from *Chlorella vulgaris* cultivated in aquaculture wastewater for the production of liquid biofuels was determined through the characterization of the wastewater obtained in the sector of Nanegalito - Ecuador. Cell growth was analyzed in terms of optical density, cell count and dry weight, obtaining 0.47 g/L of biomass with a specific productivity of 0.083 d⁻¹. The physicochemical parameters of the water were determined, obtaining a removal of 93.43% of total organic carbon (TOC), 96.34% of total nitrogen (TN) and 92.19% of total phosphorus (TP). A lipid production of 23.01% with the mix chloroform-methanol (1:2), a free fatty acid (FFA) production of 46.41% with chloroform-methanol (1:2) and a percentage of 88.9% of fatty acid methyl esters (FAME) were recorded with the help of the sulfuric acid as catalyst. This work demonstrates the functionality of aquaculture wastewater to produce lipids from *C. vulgaris* microalgal biomass, but not for the efficient production of FFA and FAME.

Key words: *Chlorella vulgaris*, aquaculture wastewater, nutrient removal, lipids.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

1. INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales son aquellas aguas que por causa del hombre y sus actividades (industrial, doméstica, agrícola, etc.) pueden presentar un riesgo grave a la salud y al medioambiente debido a su alta concentración de impurezas y sustancias contaminantes que requieren un tratamiento para ser vertidas nuevamente a la naturaleza (Neczaj & Grosser, 2018; Warwick et al., 2013). Estas aguas contienen una matriz compleja de distintos componentes categorizados en físicos, químicos y biológicos. Los componentes físicos presentan concentraciones significativas de sólidos suspendidos, observaciones anormales en temperatura y color; los compuestos químicos pueden ser representados por sustancias orgánicas como pesticidas, aceites y compuestos orgánicos volátiles o sustancias inorgánicas como metales pesados, dureza, pH, nitrógeno, fósforo, azufre, micro contaminantes y valores elevados de Demanda Química de Oxígeno (DQO) (Warwick et al., 2013); y, finalmente, compuestos biológicos representados por microorganismos como bacterias, hongos, nemátodos y otros pequeños animales y plantas que se proliferan bajo estas condiciones.

Cerca del 80% de las aguas residuales en el mundo son vertidas directamente a cuerpos de agua naturales sin un tratamiento previo efectivo según datos del Banco Mundial (2020). Como producto de la falta de tratamiento de estas aguas residuales de orígenes diversos, se produce una afectación en el medioambiente causando una eutrofización, agotamiento de oxígeno en el agua (Singh et al., 2017) e intoxicación de la fauna acuática natural; sin dejar de lado que estos efluentes pueden presentar patógenos, antibióticos, metales pesados, hormonas, entre otros, que alteren el bienestar de la salud humana (Chatla et al., 2020). De esta manera, se ha etiquetado a las aguas residuales como potenciales contaminantes para el medio ambiente.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Una de las actividades económicas que ocasiona preocupación al generar grandes cantidades de aguas residuales no procesadas adecuadamente es el sector acuícola. En la actualidad, la gran demanda de alimentos a nivel mundial provocada por el incremento constante de la población ha sido sostenida, en su gran mayoría, por la industria acuícola para garantizar la seguridad alimentaria y evitar la escases de alimentos. En un estudio realizado en la India, se determinó que entre los años 2016 a 2018 el consumo de pescado fue del 52% y para el año 2028 aumentará al 58% (Tom et al., 2021), atentando directamente a las fuentes de agua naturales si no se prevé un tratamiento efectivo que no contamine el agua dulce para el ser humano.

A nivel mundial, China e India ocupan los primeros lugares en la producción acuícola teniendo una participación del 7.1% según la FAO en 2018 (Ghosh, 2020). Dentro de esta perspectiva, Latinoamérica no es la excepción, en datos estadísticos este continente representa el 12.1% de la producción acuícola en volúmenes mundiales, siendo el 77% de este valor, producción total de Chile, Brasil y Ecuador; países centrados en la exportación de diversos tipos de pescado, moluscos y mariscos (Wurmann, 2019). Para el Ecuador, esto representa cerca de 575.8 millones de dólares anuales con una tasa de crecimiento del 0.5% en promedio de la producción total en el sector acuícola. Especies como la trucha, tilapia y carpas, representan el 28% de la producción nacional (Sánchez et al., 2015), y el resto corresponde al cultivo de camarón ecuatoriano, producto predilecto que ocupa el primer lugar en el mundo.

En Ecuador, los organismos como los Departamentos de Gestión Ambiental de las Prefecturas Provinciales y Alcaldías, de acuerdo con el marco legal, y encabezados por el MAE (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición ecológica) (Peña et al., 2018) presentan

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

una amplia legislación ambiental que los compromete como instituciones públicas a velar, controlar y regular las descargas de aguas residuales. De este modo, el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) determinó en su informe sobre estadística de información ambiental económica en gobiernos autónomos descentralizados municipales (INEC, 2016) que en el país cuenta con cerca de 421 plantas de tratamiento de aguas residuales, de las cuales el 50% se encuentran en la región Sierra y según las estadísticas arrojadas, 133 municipios que tienen la capacidad de tratar aguas residuales. De estos municipios solo 51 realizan el tratamiento de forma parcial y 82 municipios no realizan ningún tratamientos en las aguas residuales. El 59.26% de los Gobiernos Autónomos Descentralizados vierten las aguas no tratadas directamente a los ríos y, cerca del 25.19% lo hacen en quebradas y en otros lugares. En Galápagos el 100% de las aguas que no se tratan son vertidas al mar (INEC, 2016). Estos datos representan una alerta de emergencia y la necesidad de presentar propuestas de valor con relación a un tratamiento eficiente para eliminar cualquier tipo de impureza en las aguas residuales que reduzca significativamente el impacto negativo sobre el entorno, garantizando la seguridad no solo ecológica, sino también económica y ambiental en la industria.

Como se mencionó anteriormente, una de las principales fuentes de aguas residuales en Ecuador proviene de la acuicultura; en este aspecto, uno de los sectores más importantes en la provincia de Pichincha es Nanegalito, lugar característico por su impacto comercial y productivo encaminado al criadero de especies como truchas, tilapias y carpas, en donde se encuentran la gran mayoría de piscícolas de la capital. Estas piscinas de criadero presentan en su composición, concentraciones altas de alimento para especies acuáticas y ciertos productos químicos empleados en la industria acuícola, que en conjunto concentran grandes

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

cantidades de nutrientes y sólidos disueltos en esta agua residual. Los principales desechos presentes en las granjas acuícolas se clasifican en seis grupos importantes: residuos de alimentos y materia fecal, subproductos metabólicos, residuos de biocidas, desechos derivados de fertilizantes, desechos por descomposición o muda de organismos y floraciones de algas. Se ha determinado que el principal componente de las aguas residuales acuícolas proviene de alimentos no consumidos (30%) y las heces de los peces (30%) (Chatla et al., 2020).

Desde esta perspectiva, se han planteado técnicas y procesos que puedan contribuir con el tratamiento de las aguas residuales provenientes de actividades acuícolas, en donde se han empleado métodos como biofiltros sumergidos, humedales artificiales, biopelículas (*biofilms- por su nombre en Inglés*) (Chatla et al., 2020; Li et al., 2020), diques ecológicos, entre otros, para eliminar todo tipo de contaminantes. Sin embargo, el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales es un método biotecnológico que ha llamado la atención de la comunidad científica gracias a su bajo costo de producción (Pozzobon et al., 2021) y su comprobada eficiencia en la remoción de nutrientes; en comparación de los tratamientos convencionales que requieren una alta inversión, consumo de energía y mantenimiento (Tom et al., 2021; Vovk et al., 2020). Además, el uso de aguas residuales se encuentra relacionadas con un coste de tratamiento insignificante para la industria, lo que convendría utilizar este tipo de residuo para obtener un coproducto como fuente de beneficios (Kwon et al., 2020).

Gracias a varios estudios, se mantiene una evidencia contundente sobre la funcionalidad de las microalgas y las aguas residuales. Acién et al., (2016) lo demostraron en su trabajo donde corroboran que especies de los géneros *Nitzchia*, *Chlorella*, *Oscillatoria* y *Scenedesmus*, presentan una tolerancia a la contaminación relativamente alta en

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

comparación a otras microalgas y que pueden ser usadas en el tratamiento de aguas residuales (Acién et al., 2016). En esta investigación se trabajó con *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*), un organismo unicelular descubierto en el año de 1890 por Martinus Willen Beijerick, un microbiólogo y botánico de origen holandés (Prono, 2022). Esta microalga fotosintética pertenece al reino Protista, y está situada en la división *Chlorophyta* del orden *Chlorococcales* (Gómez et al., 2011). Su familia corresponde a *Chlorellaceae* del género *Chlorella* (Guiry & Guiry, 2022), es caracterizada por su color verde y su forma esférica entre 2 a 10 μm de diámetro (Safi et al., 2014). Esta especie es una de las más estudiadas en el ámbito experimental ya que propone una metodología sencilla y económica para su supervivencia y presenta una tasa de crecimiento elevado en comparación de otras especies. Según Galves (2014), *C. vulgaris* en un lapso de 20 horas se dividirá en cuatro células nuevas, lo que comprueba la especial importancia de estudio de esta especie como fuente principal de compuestos de valor agregado.

Para que las microalgas puedan crecer de forma óptima se requieren concentraciones de fósforo, nitrógeno y carbono específicas. El agua residual de origen acuícola contiene una alta carga orgánica que sería capaz de proveer las condiciones favorables para el cultivo de *C. vulgaris* (de Oliveira et al., 2020). Por lo tanto, se estima que dichas aguas residuales proporcionan los nutrientes necesarios para que las microalgas puedan asimilar concentraciones necesarias de carbono, nitrógeno y fósforo, asegurando la acumulación de biomasa. Además, al emplear estos microorganismos fotosintéticos en los procesos de tratamiento de aguas residuales en la acuicultura, se garantiza la biofijación del CO_2 y según investigaciones recientes se ha concluido que se puede remover hasta un 95% de este gas de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

efecto invernadero (Acién et al., 2016; Li et al., 2020); así como de compuestos nitrogenados y fosfatados, elementos perjudiciales para los efluentes acuáticos y el ser humano.

Por otro lado, se ha identificado una peculiaridad al inocular ciertas microalgas en un agua residual, ya que no solo remueven los elementos contaminantes de su medio, sino que, bajo una fuerte disponibilidad de nutrientes como el carbono, nitrógeno y fósforo, *C. vulgaris* incrementa su producción de biomasa. Esto ha despertado un interés singular enfocado a la producción de biocombustibles como alternativa prometedora de una fuente de energía limpia en el transporte y la generación de energía renovable (Abdullah et al., 2019).

Se sabe que los biocombustibles son combustibles que se originan a partir de cierta materia biológica que es renovable a lo largo del tiempo garantizando emisiones que no dañen al ambiente (Alalwan et al., 2019). Los biocombustibles se emplearon hace varios siglos atrás siendo reemplazados por el petróleo. Existen varias generaciones para clasificar a los biocombustibles según la materia prima empleada, estas son:

Biocombustibles de Primera Generación: En esta categoría se incluyen a todos los biocombustibles relacionados directamente con biomasa comestible, por ejemplo; el bioetanol obtenido a partir de la fermentación de azúcares como caña de azúcar, suero de leche, desechos alimenticios como cáscara de papa, entre otros (Abdullah et al., 2019). El biodiesel, generado con biomasa de plantas y semillas al extraer lípidos de sus estructuras y transformarlos en biocombustibles (Alalwan et al., 2019).

Biocombustibles de Segunda Generación: Son aquellos que combustibles obtenidos a partir de una gran gama de materias primas, principalmente biomasa lignocelulósica no

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

comestible. Entre ellas se encuentra la madera, residuos agrícolas o forestales y desechos sólidos municipales (Alalwan et al., 2019).

Biocombustibles de Tercera Generación: Son aquellos producidos a partir de microorganismos que, de acuerdo con investigaciones, tiene mayor rendimiento que la biomasa lignocelulósica. Este biocombustible centra la atención de la comunidad por su doble beneficio, debido a que presenta también una alta asimilación de CO₂ y por no competir con los alimentos para su cultivo en espacios terrestres (Abdullah et al., 2019; Chen et al., 2011; Sánchez-Bayo et al., 2020).

Biocombustibles de Cuarta Generación: Son aquellos combustibles que utilizan como materia prima a microorganismos genéticamente modificados que puedan sintetizar sustancias de valor agregado a través de ingeniería metabólica con aumentos significativos en lípidos o carbohidratos (Abdullah et al., 2019). Se trabaja especialmente con microalgas, bacterias y cianobacterias.

Hoy en día, el uso de microorganismos vivos que generen dentro de su estructura sustancias que puedan ser utilizadas como alternativas para problemáticas relacionadas con la deficiencia de fuentes de energía renovables y amigables con el medioambiente es el foco central de las investigaciones que pretenden establecer procesos económicos asociados a fuentes baratas de nutrientes (Singh et al., 2017), fáciles y rápidos con materias animales o vegetales que cumplan este fin. Una de las soluciones más prometedoras en la actualidad es la obtención de biocombustibles a partir de biomasa microalgal, ya que estudios previos de Ramos & Pizarro (2018), demuestran que *C. vulgaris* es idónea para su utilización como fuente de ácidos grasos en la producción de biodiesel reportando valores mayores en

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

eficiencia, productividad y rendimiento (Liang et al., 2009) a comparación que el gasóleo o diésel de petróleo.

La humanidad se enfrenta a graves problemas medioambientales que ponen en riesgo el entorno en el que vivimos y la salud de sus habitantes. Sin duda uno de los dilemas que más ha causado conflicto desde su descubrimiento es el daño que causa el uso de combustibles fósiles en el planeta y su posible restricción futura como fuente principal de energía mundial. Según Scott Foster y David Elzinga (2013), voceros de la comisión de energía sostenible para Europa de la ONU, los combustibles fósiles representan cerca del 80% de la energía utilizada a nivel mundial y se estima que para el 2050 la cantidad de carbono emitida a la atmósfera se duplicará, provocando el aumento de la temperatura terrestre en 2 °C, por lo que es indispensable la presentación de una técnica eficiente que no solo sustituya a las actuales fuentes energéticas, sino también se presente como una alternativa de origen renovable y que sea capaz de absorber la cantidad de carbono presente en el ambiente y transformarlo en productos con un beneficio sustentable.

El presente trabajo tuvo como finalidad la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME – por sus siglas en inglés), que son compuestos de origen orgánico obtenidos a través de una síntesis denominada transesterificación de ácidos grasos en reacción con metanol y en presencia de un catalizador. Estos compuestos tienen la capacidad de biodegradarse fácilmente a comparación del diésel del petróleo (Thomas et al., 2017). El biodiesel es un sustituto del diésel de petróleo compuesto por una mezcla de FAME con cadenas entre 14 a 22 carbonos. Los FAME se encuentran en los lípidos de tipo triglicéridos no polares abundantes en ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Sánchez et al., 2020), en especial el ácido oleico de 18 carbonos ideal para la producción de biodiesel. Estos lípidos

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

son moléculas biológicas caracterizadas por ser insolubles en agua, pero solubles en distintos solventes de origen orgánico, una de sus principales funciones dentro de los organismos es la proporción de energía necesaria para cumplir las actividades metabólicas gracias a su gran cantidad de enlaces entre carbono e hidrogeno (Valchev et al., 2017). También se reconocen como componentes estructurales esenciales en las membranas biológicas. Según Castillo (2017), *C. vulgaris* presenta un porcentaje del 22.8% de lípidos acumulados en su estructura, generando de forma industrial una productividad de biomasa cercana a 0.08 g/L/d, de la que se pueden extraer cerca de 0.01 g de lípidos (Gómez et al., 2022), siendo su producción una de las más económicas dentro del mercado gracias a los nutrientes presentes en los cuerpos de aguas residuales sin incurrir en costos de micro y macronutrientes.

Junto con estos enunciados, se establece que el biodiesel obtenido de los lípidos microalgales de *C. vulgaris* cultivada en agua residual de origen acuícola (Vovk et al., 2020) pueden ser fuente renovable que suministraría de forma sostenible, menos tóxica y más económica la energía requerida y, por ende, hacer del sector piscícola a nivel mundial una práctica eco amigable y sustentable en todos sus aspectos. Una de las ventajas de comercializar el biodiésel es la garantía que brinda al no generar gases de combustión nuevos al medio ambiente, como lo menciona Huang y sus colaboradores. El producto obtenido no presenta compuestos aromáticos en su estructura que luego de la combustión sean expulsados a la atmósfera, causando alteraciones en la composición y calidad de aire (Boluada et al., 2019). Por esta razón se observa que existe una baja emisión de monóxido de carbono, azufre y partículas en suspensión (Huang et al., 2010). Además, se ha determinado que este biodiesel es menos volátil, mucho más seguro al momento de transportarlo y presenta un valor de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

cetano mucho mayor al diésel, lo que resulta beneficioso en el momento de su combustión (Soleimani et al., 2021).

El motivo por el cual el biodiesel microalgal representa importancia en la comunidad científica radica en que, según estudios realizados en 2010, *C. vulgaris* es capaz de fijar cerca de 1.7 kg de CO₂ por cada kg de biomasa seca lo que contribuye a disminuir drásticamente las emisiones de efecto invernadero y reestablecer el equilibrio térmico del planeta (Arias et al., 2013), ya que no presentan una elevada huella de carbono. Es decir, cuando el biocombustible es combustionado, este no incrementan la concentración de carbono en la atmósfera, solo liberan el carbono absorbido durante el tiempo de cultivo de la microalga y mediante su fotosíntesis volverá a fijar este compuesto nuevamente obteniendo emisiones netas de carbono (Xu et al., 2022) y más limpias a comparación de otros combustibles.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, es importante recalcar que al utilizar *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola, los costos de producción se minimizan notablemente al no requerir la adquisición de nutrientes para la microalga y beneficiando al ambiente al evitar el uso de agua fresca. Asimismo, el uso de microalgas en aguas residuales constituye un tratamiento biológico, que reduce la concentración de sustancias tóxicas en las aguas residuales. Otro aspecto importante es la utilidad que se puede dar a la biomasa microalgal restante, que no representaría desperdicio o desecho, sino una materia prima funcional para otra áreas. La biomasa de *C. vulgaris* ha sido utilizada como alimento para animales y seres humanos en forma de nutraceuticos (Paniagua, 2015) gracias a su alto porcentaje de proteínas y lípidos, también como biofertilizante y para la producción de compuestos bioactivos en las industrias farmacéuticas y cosmetológicas (Swastika et al.,

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

2022), además de ser empleada como colorante en la industria textil (Pagels et al., 2020) por su amplia gama de pigmentos.

En la actualidad se está trabajando con *C. vulgaris* en temas relacionados a esta investigación, en Pakistán se ha estudiado el comportamiento de la microalga con aguas residuales de origen industrial provenientes del sector textil en simbiosis con *Enterobacter* sp. para garantizar la remoción de la mayor cantidad de nutrientes (Mubashar et al., 2020). Existen trabajos científicos que analizan el potencial de *C. vulgaris* para el tratamiento de agua residual con fines de producción de biodiesel (Ahmad et al., 2013) y estudios de tratamiento de agua residual de piscifactorías para la producción de biodiesel con otras especies de microalgas (Enwereuzoh et al., 2020). Un estudio en Brasil respalda el buen crecimiento de *C. vulgaris* en aguas residuales de un cultivo de tilapia bajo un sistema de bioflóculos de baja salinidad (de Oliveira et al., 2020). Sin embargo, la información que existe sobre el comportamiento de *C. vulgaris* siendo cultivada en agua residual acuícola enfocada a la producción de biodiesel con la obtención de un alto porcentaje de lípidos es escasa. En base a esta necesidad, se estableció como objetivo el determinar el rendimiento de lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual acuícola con fines de producción de biocombustibles líquidos iniciando con la caracterización del agua residual mediante análisis fisicoquímicos para la determinación de su uso potencial como medio de cultivo de microalgas. Posterior a esto, se analizó el crecimiento microalgal en un fotobiorreactor para la producción de biomasa con fines de extracción de lípidos, y finalmente caracterizar la fracción lipídica de la biomasa cultivada mediante procesos de extracción de lípidos totales, ácidos grasos libres y ésteres metílicos para la comprobación de su potencial en la producción de biodiésel validando o no la hipótesis de que el agua

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

residual acuícola del sector Nanegalito en Quito, presenta una cantidad de nutrientes óptima para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en 15 días de cultivo, generando un contenido de lípidos mayor al 20%, de ácidos grasos libres superior al 80% y ésteres metílicos de ácidos grasos superior al 90%, para uso potencial en la producción de biodiesel.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitio de estudio

2.1.1 Recolección del agua residual

El sector Nanegalito corresponde a una de las parroquias del distrito metropolitano en la provincia de Pichincha - Ecuador, ubicada al noroccidente de la capital entre las parroquias de Nono, Nanegal, Guala y Mindo. Nanegalito localizada a 50 km de Quito, presenta una altitud entre los 1400 a 2800 m.s.n.m, con una temperatura que varía entre los 15 °C a 22 °C. En este sector se llevó a cabo la recolección del agua residual gracias a la gran cantidad de piscinas acuícolas localizadas en la zona (Figura 1), en donde se encuentran criaderos de especies altamente comercializadas como: truchas, tilapias, carpas, etc.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA



Figura 1. Estanque acuícola de Nanegalito

2.2 Metodología

Para determinar el rendimiento de lípidos a partir de biomasa microalgal de *C. vulgaris* cultivadas en agua residual de origen acuícola con fines de producción de biocombustibles líquidos se planteó la siguiente metodología, estableciendo tres fases importantes dentro del proceso, como se observa en la Figura 2.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

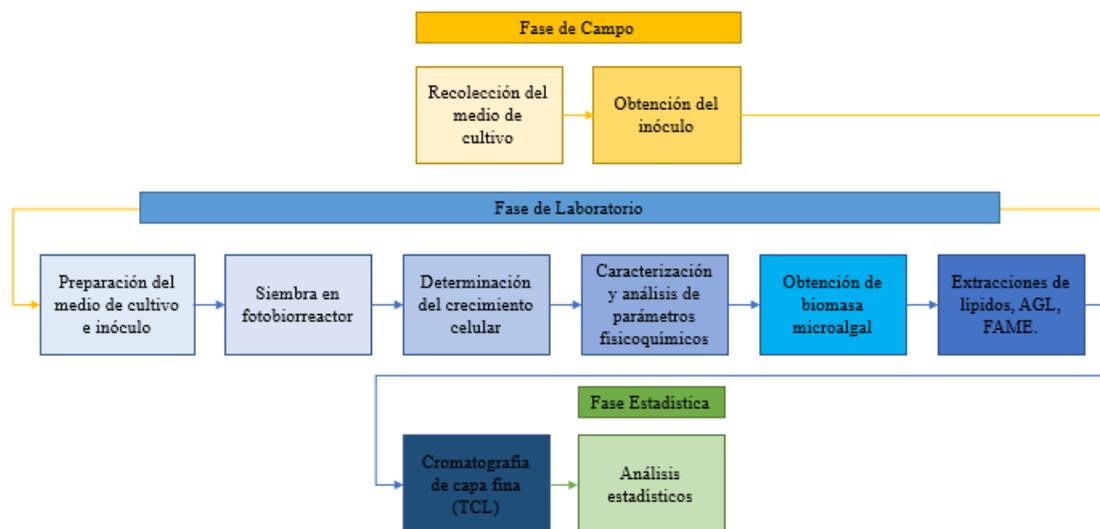


Figura 2. Flujo de trabajo para la metodología de investigación.

2.2.1 Fase de campo

- **Recolección del medio de cultivo**

Se recolectaron 60 litros de agua residual acuícola en una de las piscinas usadas como criadero de especies comerciales en Nanegalito. Con ayuda de una varilla se realizó una breve mezcla del agua para que los nutrientes depositados en la parte inferior de la piscina queden suspendidos en toda la superficie. El agua acuícola se colocó en tres canecas plásticas con una capacidad de 20 litros cada una, selladas con papel film debidamente etiquetadas y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

- **Obtención del inóculo**

Para este estudio se requirieron cepas de *Chlorella vulgaris* obtenidas del Banco Español de Algas, las cuales fueron preservadas en la ciudad de Quito, Ecuador en el Laboratorio de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la Universidad Internacional SEK bajo presión atmosférica en medio Bold's Basal Medium (BBM) de tipo

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

líquido que aseguró la subsistencia y crecimiento de estas microalgas verdes de agua dulce proporcionando sus nutrientes vitales (Nichols & Bold, 1965; UTEX, 2019) a lo largo de toda la fase experimental. El BBM contenía 10 g de NaNO₃, 3 g de MgSO₄ · 7H₂O, 1 g de NaCl, 3 g de K₂HPO₄, 7 g de KH₂PO₄, 1g de CaCl₂ · 2H₂O. Como elementos traza en solución se colocaron 8.82 g de ZnSO₄ · 7H₂O, 1.44 g de MnCl₂ · 4H₂O, 0.71 g de MoO₃, 1.57 g de CuSO₄ · 5H₂O, 0.49 g de Co (NO₃)₂ · 6H₂O y 11.42 g de H₃BO₃, 50 g de EDTA, 31 g de KOH, 4.98 g de FeSO₄ · 7H₂O y 1 mL de H₂SO₄ concentrado. Los elementos fueron diluidos en agua destilada de acuerdo con los stocks establecidos por Stein (1973) y autoclavados previo su hizo con la microalga.

2.2.2 Fase de Laboratorio

- **Preparación del medio de cultivo e inóculo**

Se autoclavaron 40 litros de agua residual obtenida en Nanegalito de origen acuícola en pírex de 5 galones de capacidad, se colocaron en autoclave a una presión de 121 °C y 15 psi durante 30 minutos para su esterilización, se dejó enfriar el agua a temperatura ambiente durante 12 horas y se procedió a filtrar el medio de cultivo con ayuda de un filtro multicapa con un diámetro de poro de 0.6 a 1.6 mm, para retener los sólidos suspendidos presentes en el agua acuícola.

El inóculo se mantuvo en botellas autoclavables de 1 litro con 800 mL de medio BBM y *C. vulgaris* por un lapso de 7 días hasta alcanzar una concentración celular adecuada (~10⁵cel/mL). Los reactores se adaptaron con filtros de entrada y salida de aire con un poro de 0.45 µm, a temperatura ambiente y bajo condiciones controladas de irradiancia lumínica

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

con luz artificial constante a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, como lo indica (Chia et al., 2013) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

- **Siembra en fotobiorreactor**

En un fotobiorreactor de vidrio (71.3 cm de largo x 8.8 cm de ancho x 61 cm de alto), acoplado a una termocupla y con unas mangueras de aireación conectadas a un compresor para un burbujeo constante, se colocaron 36 litros de agua residual anteriormente filtrada y autoclavada, a la cual se inoculó con 4 litros de cultivo de *C. vulgaris* con una densidad celular de $2.357 \cdot 10^6$ cel/mL preservado en los reactores de conservación. Se estableció una relación entre el medio de cultivo y la cepa microalgal con una dilución de 1:10 en el fotobiorreactor, el cual se mantuvo en el mes de diciembre del 2021 bajo condiciones atmosféricas de la ciudad de Quito con una temperatura controlada de 28 ± 2 °C y con un flujo de aire de 4.2 L/min. Se mantuvo un pH constante de 6.77 ± 0.34 a lo largo de los 12 días. Se estableció un control con medio BBM para el análisis fisicoquímico.

- **Determinación del crecimiento celular**

Por un lapso de 12 días se recolectaron diariamente 50 mL de muestra, estas fueron tomadas del fotobiorreactor en botellas de plástico, de 100 mL de capacidad, previamente lavadas y desinfectadas bajo luz UV. Inmediatamente se llevaron a un refrigerador durante 24 horas a 4 °C para minimizar el crecimiento celular (Liang et al., 2009). Para la determinación del crecimiento se realizó mediante tres metodologías específicas: por densidad óptica, conteo celular y peso seco.

- Densidad Óptica

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

El crecimiento celular microalgal se midió por densidad óptica a través de espectrofotometría, el procedimiento se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por Arias (2013). Se requirió un espectrofotómetro marca HACH 5000 calibrado a una longitud de onda de 680 nm, longitud a la que es posible determinar la densidad óptica de *C. vulgaris*. En una celda de vidrio se colocó 1 mL de la muestra recolectada en la botella de plástico, previamente agitada para su homogenización, se midió y registró los datos por triplicado; el blanco fue el agua acuícola sin *C. vulgaris*. Se procedió a medir el restante de muestras hasta el día 12.

○ Conteo Celular

Para la determinación de biomasa microalgal por conteo celular se realizó con ayuda de una cámara de Neubauer siguiendo el protocolo de Bastidas (2011), con ayuda de un microscopio óptico marca Leica para poder visualizar las células a 40X. En la Figura 3 se observa a *C. vulgaris* en el medio de cultivo acuícola a 100X.

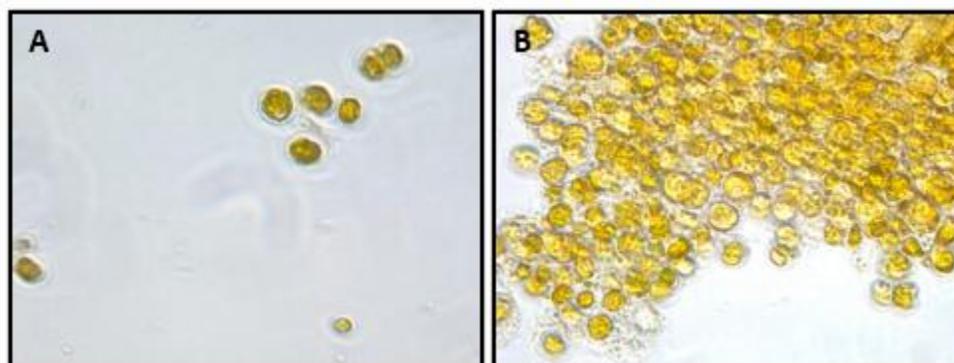


Figura 3. *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual acuícola vista desde un microscopio con objetivo de 100X. A muestra a *C. vulgaris* en el día 1 después de su inoculación en el agua residual acuícola. B muestra a *C. vulgaris* en el día final de su cultivo. Fotografías elaboradas por el autor.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

En las muestras con gran concentración de *C. vulgaris* se realizó una dilución 1:100 para hacer posible el conteo. Se contó y registró los datos por triplicado calculando la concentración celular con la Ecuación (1).

$$\text{Concentración celular} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{núm. células} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) \cdot 10.000}{\text{núm. cuadros}} \cdot \text{dilución} \quad (1)$$

○ Peso Seco

Se realizó peso seco para determinar la concentración de biomasa microalgal por gravimetría con apoyo de un vidrio reloj y un papel filtro siguiendo el procedimiento de (Gaspar, 2019); se dejó secar papel filtro de 125 mm de diámetro en una estufa de marca *WiseVen Scientific* a 60 °C por 24 horas, se colocó el papel filtro previamente enfriado a temperatura ambiente en un desecador por 30 minutos y con ayuda de una balanza analítica se pesó el papel vacío. Se repitió el procedimiento hasta obtener un peso constante. Posteriormente, se colocó 1 mL de muestra y se dejó secar a 60 °C por 24 horas más (Sánchez & Martínez, 2012). Finalmente, se pesó el filtro con la muestra de microalgas y se aplicó la siguiente Ecuación (2) por diferencia de pesos.

$$\text{Peso Seco} \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{(\text{filtro seco} + \text{muestra seca})(\text{g}) - \text{filtro inicial} (\text{g})}{\text{volumen de muestra} (\text{mL})} \quad (2)$$

Se determinó la productividad total de la biomasa obtenida con *C. vulgaris*, de acuerdo a la Ecuación (3) utilizada por Guasumba (2022), en donde relaciona la biomasa total (seca y húmeda) obtenida en gramos (g) para el volumen total del cultivo expresado en litros (L) por el tiempo final del cultivo representado en días (d).

$$\text{Productividad total} = \frac{\text{Biomasa total} (\text{g})}{\text{Volumen} (\text{L}) \cdot \text{Tiempo} (\text{t})} \quad (3)$$

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

- **Caracterización del agua residual acuícola y análisis de parámetros fisicoquímicos.**

Se realizó la caracterización fisicoquímica del agua residual acuícola con 4 litros del agua obtenida en Nanegalito y con el sobrenadante obtenido al finalizar el cultivo a través de los siguientes métodos estandarizados expresados en el Anexo 1. Para determinar la concentración y el porcentaje de remoción de N, C y P Total se centrifugaron las muestras extraídas por día en tubos Falcon de 50 mL en una centrifugadora de marca Boeco C-28A a 4000 rpm durante 5 minutos. La centrifugación ocasionó que la muestra se separara en dos fases; en donde la biomasa se guardó para análisis posteriores y el sobrenadante se utilizó como muestra en la determinación de macronutrientes como:

- Nitrógeno Total por digestión con persulfato según el método 10072 establecido por HACH (2015).
- Carbono Total para la determinación de la concentración de carbono orgánico presente en las muestras según el método 10128 mencionado por la compañía HACH (2014a).
- Fósforo Total por la digestión con molibdeno y ácido persulfato según el método 10127 señalado en HACH (2014b).

Se calculó el porcentaje de remoción de nutrientes en base a la Ecuación (4) establecido por Eladel (2019) que relaciona la diferencia entre la concentración inicial del nutriente (C_I) y la concentración final del mismo (C_F) para la misma concentración inicial del nutriente (C_I) por

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

100% que determinará el grado de eliminación de un determinado nutriente en el agua residual.

$$\% \text{ Remoción Nutrientes} = \frac{(C_I - C_F)}{C_I} \cdot 100\% \quad (4)$$

Se realizó la caracterización del agua residual acuícola obtenida en las piscinas de criadero de peces para determinar la concentración de nutrientes inicial según los siguientes protocolos.

- **Obtención de biomasa microalgal**

Transcurridos los 12 días y al comprobar mediante conteo celular que iniciaba la fase de muerte celular se vació el fotobiorreactor colocando el contenido en pírex previamente esterilizado, se trasladaron a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas en la Universidad Internacional SEK para ser tratados. Se centrifugó todo el volumen cosechado a 4000 rpm durante 5 minutos por triplicado en tubos Falcon de 50 mL para obtener la mayor cantidad de biomasa. Se reservaron 2 litros del sobrenadante para pruebas de análisis por absorción atómicas en laboratorios externos. Después de tener toda la biomasa recolectada, una parte se dispuso como biomasa húmeda y se refrigeró a -4 °C y la otra parte se dejó secar a 100 °C en una estufa para obtener biomasa seca. Todas las muestras se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como el promedio con su desviación estándar.

- **Extracciones de lípidos**

Para el presente estudio se establece el procedimiento realizado para obtener lípidos, ácidos grasos y ésteres metílicos de ácidos grasos provenientes de *C. vulgaris*. Se empleó la biomasa microalgal húmeda y seca preservada con anterioridad. Las extracciones se llevaron a cabo con cloroformo: metanol (1:2), hexano, acetato de etilo, metilciclohexano, metanol y

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

etanol como solventes orgánicos extractores. La selección de solventes se realizó con base en revisión bibliográfica (Guasumba, 2022; Herrera, 2021; Sánchez-Bayo et al., 2020).

○ Extracción de lípidos totales

La extracción de lípidos totales se realizó según el procedimiento establecido por Bligh & Dyer (1959), Hadrich (2018) y Salazar (2012) con ciertas modificaciones expuesta por Kumar (2015) al incluir el lavado con NaCl al 0.58% para incrementar la pureza de la muestra y varias centrifugaciones a 4000 rpm para homogenizar la extracción, siguiendo las recomendaciones de Aguilar (2011). Como mecanismo de disrupción celular se utilizó sonicación para romper la pared y la membrana (Adam et al., 2012) de *C. vulgaris*. Se requirió aproximadamente 6.1514 g de biomasa seca y 6.1924 g de biomasa húmeda total para el procedimiento, tomando en cuenta que se realizó la extracción con cada solvente por triplicado.

$$\text{Contenido lipídico (\%)} = \frac{P_L}{P_B} \cdot 100\% \quad (5)$$

Se pudo determinar el porcentaje total de lípidos de cada solvente extractor por gravimetría con ayuda de la Ecuación (5) establecido por Hadrich (2018) y Zhu (2016); en donde P_L hace referencia al peso del frasco con el contenido lipídico extraído y seco en gramos, y P_B al peso de la biomasa microalgal seca o húmeda en gramos, siendo el porcentaje representado en % m/m. Para determinar la productividad total volumétrica de lípidos se utilizó la Ecuación (6), descrita por Guasumba (2022); donde M_L representa la masa de los lípidos, (V) el volumen del cultivo expresado en litros, y (t), el tiempo determinado en días.

$$\text{Productividad Total Volumétrica} \left(\frac{g}{l \cdot d} \right) = \frac{M_L}{V \cdot t} \quad (6)$$

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Se determinó la productividad específica de biomasa en base a la productividad volumétrica de biomasa expresada en g/L/d por la concentración de biomasa obtenida en g/L, como se observa en la Ecuación (7). Todas las muestras se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como el promedio con su desviación estándar.

$$Productividad\ Específica\ Biomasa = \frac{Prod.\ Vol\ Biomasa\ \left(\frac{g}{L \cdot d}\right)}{Conc.\ Biomasa\ \left(\frac{g}{L}\right)} \quad (7)$$

○ Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL)

Se procedió a realizar la extracción de ácidos grasos libres con 0.5 gramos de biomasa seca de *C. vulgaris* de acuerdo con el protocolo de Toumi (2022), en el cual se preparó la muestra mediante saponificación de biomasa con 20 mL de metanol y 0.1 gramo de KOH como base. La muestra permaneció en un equipo de reflujo constante cerca de 4 horas a 300 rpm y 60 °C en baño térmico como se observa en la Figura 4A.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA



Figura 4. Equipo de reflujo para saponificación de biomasa de *C. vulgaris*. A representa el equipo necesario para el reflujo en la saponificación de la biomasa de *C. vulgaris*. B representa el proceso de extracción de los ácidos grasos libres de *C. vulgaris*.

Luego, para la purificación se filtró la muestra con una bomba al vacío y se ajustó el pH con HCl 1 M; en un embudo de decantación se observó la separación de dos fases correspondientes a una orgánica representada por ácidos grasos y otra inorgánica compuesta por residuos contaminantes no lipídicos (Abedini Najafabadi et al., 2015) como se observa en la Figura 4B. Para la determinación del porcentaje lipídico de ácidos grasos se midió por gravimetría el peso del frasco vacío (T_1) y el peso del frasco con ácidos grasos libres (T_2) en gramos por el peso inicial de biomasa utilizada para la extracción (W) usando la Ecuación (8) mencionada por Guasumba (2022). Todos los porcentajes se representaron en % m/m. Todas las muestras se realizaron por triplicados y los resultados se expresan como el promedio con su desviación estándar.

$$\%AGL = \left(\frac{T_2 - T_1}{W} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

- Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME)

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Para la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se realizó el flujo de trabajo indicado en la Figura 5A, en donde se partió por el proceso de transesterificación por reacción directa, indirecta y ácidos grasos libres, con ayuda de catalizadores ácidos, sea este homogéneo como ácido sulfúrico (H_2SO_4) y heterogéneo como la resina comercial CT-269DR, los cuales estuvieron implicados en cada reacción por triplicado. El protocolo se estableció de acuerdo con lo mencionado por Belkhanchi (2021) y Sánchez-Bayo (2020) en la producción de FAME con una relación entre catalizador, solvente y biomasa de (1.74:30:10) para el H_2SO_4 y de (1.1:100:1) para la resina; manteniendo por una temperatura constante de 90 °C por 4 horas un set de tubos de vidrio con agitadores sumergidos en un baño térmico a 400 rpm.

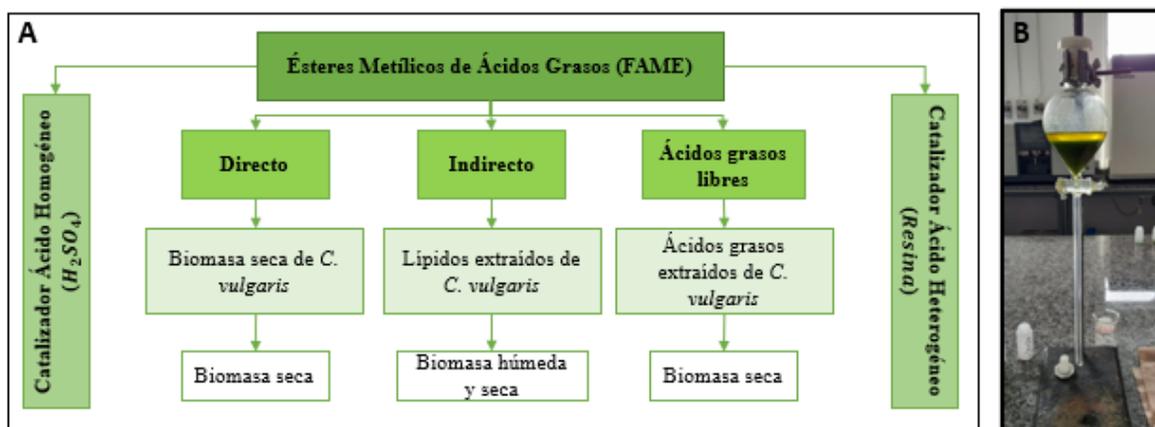


Figura 5. Proceso para la obtención de FAME. A representa el flujo de trabajo llevado a cabo para la obtención de FAME. B representa la purificación para la obtención de biodiesel a partir de biomasa de *C. vulgaris*.

Pasado el tiempo se llevó la muestra a un filtro al vacío para retener las impurezas y se procedió a realizar la purificación en un embudo de decantación de 100 mL, en donde se realizó un lavado con 5 mL de agua mili Q y 2 mL de hexano: dietiléter (80:20) esperando de 2 a 5 minutos la separación de fases, como se observa en la Figura 5B. Con ayuda de una pipeta Pasteur se extrajo la fase orgánica comprendida por los ésteres metílicos de ácidos

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

grasos de interés. Se cuantificó el porcentaje de ésteres metílicos por gravimetría en frascos expuestos en una estufa a 90 °C por 24 horas y de acuerdo con la Ecuación (9) (Guasumba, 2022; Herrera, 2021), en donde se determina el porcentaje por la diferencia de pesos en gramos entre el frasco con los FAME extraídos (T_2) y el frasco vacío (T_1) por la biomasa usada (W) en gramos. Todos los porcentajes se representaron en % m/m. Todas las muestras se realizaron por triplicados y los resultados se expresan como el promedio con su desviación estándar.

$$\% FAME = \left(\frac{T_2 - T_1}{W} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

- **Cromatografía por capa fina (Thin layer chromatography-TLC)**

Se realizó una comprobación a través de TLC para lo cual se requirió una placa de gel de sílice de 40 x 80 mm de la marca ALUGRAM Xtra Sil de 0.2 mm de sílica gel, se colocó la placa sobre un papel absorbente y a 1 cm de la base se trazó una línea con un lápiz de grafito, se marcaron los 3 puntos de ubicación para las muestras (estándar, lípidos de AGL y lípidos de FAME). Durante 30 minutos se mantuvo la placa en una estufa para su activación a 100 °C; pasado el tiempo se colocaron las muestras disueltas con 3 μ L de su propio solvente extractor y con un tubo capilar de 1.4 mm de diámetro se asentó en la placa. El estándar utilizado fue oleato de colesterol de la marca Sigma resuspendido con 1 mL de cloroformo por cada 100 mg del estándar. Se dejó reposar la placa sobre la fase móvil de cloroformo puro en un frasco con tapa por 10 minutos y se reveló la corrida a través de vapores de yodo en un frasco con perlas de yodo y sílica gel por 10 minutos más, análogamente al protocolo de Cabrera (2016). La TLC se realizó con el mejor solvente extractor de AGL y FAME. El factor de retención (R_f) se calculó con la Ecuación (10) mencionada por Rodríguez (2008)

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

que relaciona la distancia recorrida en cm por la muestra dividida entre la distancia total recorrida por la fase móvil en cm. Todas las muestras se realizaron por triplicados y los resultados se expresan como el promedio con su desviación estándar.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra (Y)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente (X)}} \quad (10)$$

2.2.3 Fase de Análisis Estadísticos

Para los datos obtenidos en la determinación del crecimiento celular de *C. vulgaris* (conteo celular, densidad óptica y peso seco) y los parámetros fisicoquímicos (Nitrógeno Total, Carbono Total y Fósforo Total) se realizaron por triplicado y para las extracciones de interés los procesos se llevaron a cabo por triplicado, estableciendo una comparación entre las medias de los valores arrojados por las pruebas analizadas por Kruskal Wallis, gracias al programa IBM SPSS Statistics versión 25 siendo, dichas diferencias, significativas cuando el valor p sea mayor a 0.05 ($p > 0.05$).

3. RESULTADOS

3.1 Determinación del crecimiento celular

3.1.1 Densidad Óptica

En la Figura 6 se pudo observar el comportamiento de *C. vulgaris* al ser cultivada en agua residual acuícola, cuyo crecimiento fue medido por densidad óptica. Esta técnica mostró que la microalga tuvo un crecimiento relativamente mayor siendo cultivada en el agua residual acuícola en comparación de su control. *C. vulgaris* inició con una densidad óptica

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

de 0.572 ± 0.0123 al ser inoculada en el medio de agua residual acuícola en el día cero y mantuvo un crecimiento exponencial hasta el día 7, en donde se aprecia el incremento de absorción de 1.165 ± 0.0087 a 1.915 ± 0.006 , siendo este día el de mayor densidad óptica. A partir del día 9 se observa un decrecimiento de absorción desde 1.901 ± 0.017 a 1.712 ± 0.003 en el día 10, finalizando con 1.333 ± 0.004 en el día 12 del cultivo.

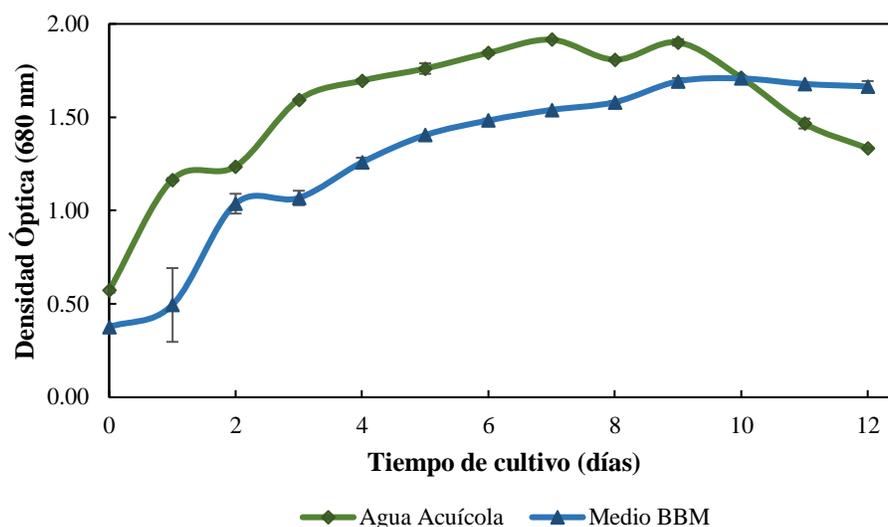


Figura 6. Densidad óptica de *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola y su control en medio BBM. En el eje de las ordenadas se presenta la densidad óptica a 680 nm y en el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días de *C. vulgaris*. Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

Con respecto al control en el medio BBM, los datos mostraron valores cercanos a los del cultivo en el agua residual, iniciando con 0.376 ± 0.017 en el día cero y aumentando exponencialmente la absorbancia hasta el día 10 con 1.708 ± 0.013 , siendo este día el de mayor densidad óptica en el cultivo; luego, en los días restantes el crecimiento fue decreciendo hasta 1.665 ± 0.029 en el día 12 del cultivo. Además, se observó que en el día 9 la densidad óptica tomada del control sigue aumentando considerablemente a comparación de la tomada en el agua residual, la cual disminuyó su concentración drásticamente.

3.1.2 *Conteo celular*

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Los resultados obtenidos de acuerdo con el número de células reportadas durante los 12 días de cultivo se registran en la Figura 7, en donde se visualiza la curva de crecimiento de *C. vulgaris*. Se identifica una fase de adaptación de *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola comprendida entre el día 0 al día 4 con una concentración celular que va de $1.34 \cdot 10^6 \pm 3.31 \cdot 10^4$ cel/mL hasta $1.85 \cdot 10^6 \pm 7.73 \cdot 10^4$ cel/mL, la fase exponencial se observa del día 4 al 7 incrementando su concentración hasta $3.13 \cdot 10^6 \pm 1.1 \cdot 10^5$ cel/mL y luego pasando a un estado estacionario en donde el número de células mantuvo una concentración promedio de $3.45 \cdot 10^6 \pm 7.73 \cdot 10^4$ cel/mL desde el día 8 al 10. Finalmente, la fase de muerte celular se identificó del día 10 al 12 disminuyendo la concentración celular hasta $3.19 \cdot 10^6 \pm 1.77 \cdot 10^5$ cel/mL. El día con mayor concentración celular fue el 9 con $3.55 \cdot 10^6 \pm 2.43 \cdot 10^5$ cel/mL. Un comportamiento similar se obtuvo con el cultivo control en BBM llegando a obtener $5.13 \cdot 10^6 \pm 1.44 \cdot 10^5$ cel/mL en el día 9, una concentración mucho mayor a la registrada por el agua residual.

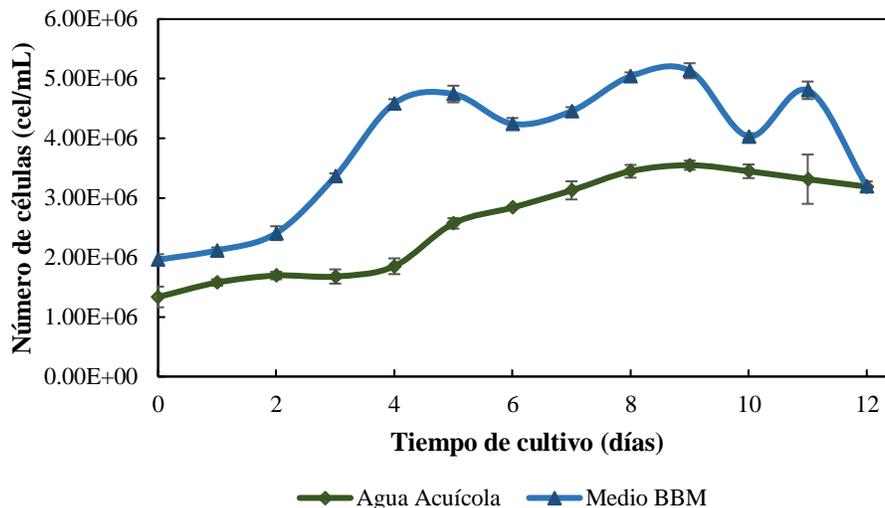


Figura 7. Conteo celular de *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola y su control en medio BBM. La figura se expresa en (cel/mL) vs. tiempo de cultivo (días). Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

C. vulgaris presentó un crecimiento levemente mayor al ser cultivada en su control de BBM presentado en la Figura 7 a comparación de la cultivada en el agua acuícola, registrándose una concentración de $1.96 \cdot 10^6 \pm 1.1 \cdot 10^4$ cel/mL en el día cero y aumentando exponencialmente hasta el día 5 con $4.74 \cdot 10^6 \pm 7.73 \cdot 10^4$ cel/mL. A partir de este día se observa un comportamiento sinusoidal, con una concentración disminuida de $4.24 \cdot 10^6 \pm 9.94 \cdot 10^4$ y $4.03 \cdot 10^6 \pm 6.63 \cdot 10^4$ cel/mL en el día 6 y 10, respectivamente y un aumento de concentración posterior en el día 9 y 11, llegando a concentraciones de $5.13 \cdot 10^6 \pm 1.43 \cdot 10^5$ y $4.8 \cdot 10^6 \pm 7.18 \cdot 10^5$ cel/mL. Finalmente, el control de BBM y el cultivo en agua residual comparten la misma concentración en el día 12 de cultivo, siendo esta $3.2 \cdot 10^6 \pm 5.52 \cdot 10^4$ cel/mL.

3.1.3 Peso Seco

Con referencia al peso seco de *C. vulgaris* observada en la Figura 8, inició en el día cero con 0.005 ± 0.0008 g/L, del día 1 al día 4 se observa un comportamiento lineal de crecimiento con 0.0109 ± 0.0012 g/L. A partir del día 5 la microalga crece de forma exponencial hasta el día 10, llegando a una concentración de 0.0321 ± 0.0021 g/L. Luego de este periodo en los días 11 y 12 *C. vulgaris* empieza a verse afectada en su crecimiento, terminando con una concentración de 0.0298 ± 0.0025 g/L. Se evidencia que entre el día 6 al 7 existe un aumento significativo de concentración microalgal.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

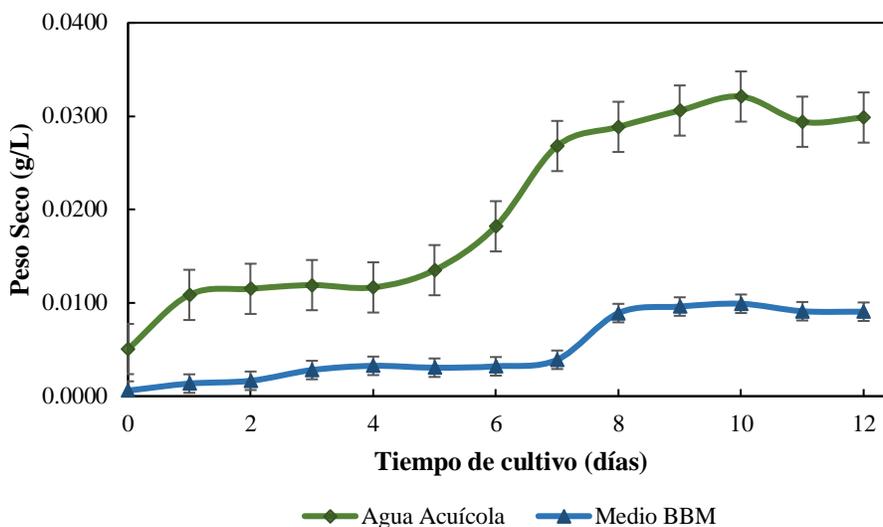


Figura 8. Peso seco de *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola y medio BBM. En el eje de las ordenas se presenta la cantidad de biomasa microalgal en g/L y en el eje de las abscisas se coloca el tiempo de cultivo de en días. Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

Con referencia al control de BBM se observó que la microalga tuvo un crecimiento mucho menor referente al agua residual utilizada, se registró un valor de 0.0006 g/L en el día inicial del cultivo, el cual fue incrementándose paulatinamente hasta el día 7 con $0.0039 \pm 4.24 \cdot 10^{-4}$ g/L. Para el día 8 se observó un incremento significativo de biomasa obteniéndose una concentración de $0.0089 \pm 2.83 \cdot 10^{-4}$ g/L y en los días posteriores un comportamiento similar hasta el día 12 en donde el cultivo culminó con una concentración de $0.0091 \pm 9.19 \cdot 10^{-4}$ g/L. A pesar de las diferencias entre las concentraciones, es preciso observar que *C. vulgaris* presenta un comportamiento similar al incrementar su cantidad de biomasa en los días 6 a 8, indistintamente en el medio que fuera cultivada.

Tabla 1. Generación de biomasa de *C. vulgaris* total y productividad del cultivo en agua acuícola y su control BBM.

Medio de Cultivo	Agua Residual Acuícola	Control BBM
Biomasa Total (g/L)	0.47	0.45

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Productividad volumétrica (g/L/d)	0.039	0,033
Productividad específica (d⁻¹)	0.083	0.072

La Tabla 1 muestra la biomasa total, la productividad volumétrica y la productividad específica de *C. vulgaris* obtenida en el fotobiorreactor con agua acuícola como medio de cultivo y con el medio BBM (control). Se observa que el uso de agua residual de origen acuícola contribuyó eficientemente al brindar los nutrientes necesarios para el crecimiento de *C. vulgaris* obteniendo 1.03 veces más biomasa microalgal, 1.18 veces más productividad volumétrica y 1.15 veces más productividad específica usando este tipo de agua residual. La prueba estadística arrojó que no existen diferencias significativas entre el peso seco, densidad óptica y conteo celular.

3.2 Análisis de parámetros fisicoquímicos y remoción de nutrientes

De acuerdo con los análisis realizados sobre nitrógeno, fósforo y carbono, se obtuvieron las gráficas representadas en la Figura 9, en donde se muestra el porcentaje de remoción de nutrientes a lo largo de los 12 días de cultivo en el agua acuícola y su control en medio BBM. En la Figura 9A, se observa que el día con mayor concentración de nitrógeno en medio acuícola fue el día 1 presentando 314 ± 5.66 mg/L N, posterior a este día, el comportamiento de remoción de nitrógeno en el agua acuícola fue aumentando considerablemente de 12.9 % en el día 2, 32.8 % en el día 3, 69.11% en el día 4 y de 69.11% hasta 93.31% en el día 12, con una concentración final de nitrógeno total de 11.47 ± 0.70 mg/L N. En el medio BBM se observó un comportamiento exponencial en el incremento de la remoción del nutriente desde el día 0 hasta el día 12, concluyendo con una remoción final

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

del 71.01%, remoción inferior a la registrada con el medio acuícola. Se registró una concentración de N final de 10 mg/L C.

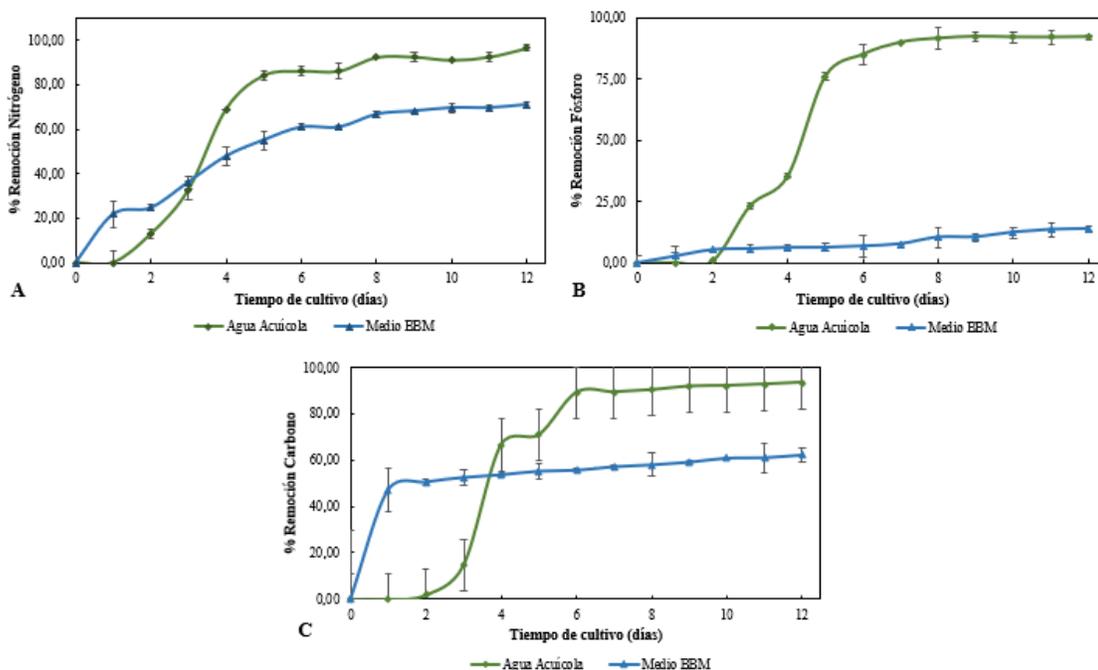


Figura 9. Porcentaje de remoción de nutrientes en *C. vulgaris* cultivada en agua residual de origen acuícola. En el eje de las abscisas se presenta el tiempo de cultivo en días y en el eje de las ordenadas se coloca el porcentaje de remoción de nutrientes. A % de remoción de nitrógeno total. B % de remoción de fósforo total. C % de remoción de carbono total. Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

Se observó en la Figura 9B como el porcentaje de remoción de fósforo en el medio acuícola fue incrementando a lo largo de los días, inicialmente tuvo una concentración de 35.85 ± 0.35 mg/L PO_4^{-3} y su remoción empezó en el día 2 con 0.78% aumentando paulatinamente en 23.25 el día 3, 35.41% en el día 4 y de 76.01% a 92.19% en el día final. El agua residual acuícola concluyó el tiempo de cultivo con una concentración de 9.5 ± 0.42 mg/L PO_4^{-3} de fósforo en el día 12. Con respecto al medio EBM se observó un ligero incremento de remoción a lo largo de todo el cultivo a comparación del medio acuícola, en donde se identificó una remoción creciente en forma lineal del nutriente, esto permitió una remoción final en el día 12 de 13.78% y una concentración de 95.7 mg/L PO_4^{-3} .

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

En la Figura 9C se representa la gráfica con los valores obtenidos de la medición de la remoción de carbono, se puede observar que el cultivo en agua residual tuvo la concentración más alta de carbono en el día 1 con 792 ± 5.66 mg/L C, la remoción de carbono inició el día 2 removiendo el 1.89% de carbono del medio y continuó el día 3 con 14.58%, el día 4 con 63.37%, el día 5 con 70.77% y a partir del día 6 al 12 una remoción final del 93.43%, esto concluye que la concentración de carbono final fue de 52 mg/L C. En el medio BBM se observó que el carbono fue removido a partir del día 1 en su gran mayoría con un porcentaje del 47.09%, correspondiente a una concentración de 136.5 mg/L C; a lo largo del tiempo de cultivo este se mantuvo con una remoción lineal creciente hasta llegar a remover el 62.21% del carbono en el medio, finalizando con una concentración de 97.5 mg/L C.

El porcentaje de remoción de carbono, nitrógeno y fósforo es visible en la Tabla 2, en donde se especifica la concentración inicial de cada nutriente, la concentración final y su remoción.

Tabla 2. Remoción total de Nitrógeno, Fósforo y Carbono por acción de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual acuícola. Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

Parámetros Físicoquímicos	Concentración Inicial	Concentración Final	Remoción Total (%)
Nitrógeno Total (mg/L N)	314 ± 5.66	11.47 ± 0.70	96.34
Fósforo Total (mg/L PO₄⁻³)	120.75 ± 1.34	9.5 ± 0.42	92.19
Carbono Orgánico Total (mg/L C)	792 ± 5.66	52 ± 0.01	93.43

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

En la Tabla 3 se observa el porcentaje de remoción de cada nutriente y metal pesado describiendo las características del agua residual acuícola y las concentraciones obtenidas al inicio del cultivo y con el sobrenadante final, posterior a los 12 días. Esto en base a los parámetros mencionados en el Anexo 1, en el que se muestran los valores límites permisibles expuestos por el MAE (ver Anexo 1).

Tabla 3. Remoción de nutrientes en agua residual acuícola por *C. vulgaris*. Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

Parámetros Físicoquímicos	Concentración Inicial	Concentración Final	Remoción Total (%)
Calcio (mg/L)	13.44 ± 0.06	11.76 ± 0.05	12.5
Cobre (mg/L)	< 0.01	0.49 ± 0.03	-
Cromo (mg/L)	< 0.01 LD	< 0.01 LD	*
Hierro (mg/L)	0.73 ± 0.04	0.17 ± 0.01	76.71
Molibdeno (mg/L)	< 0.04	< 0.04	*
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	8.30 ± 0.5	7.30 ± 0.44	12.05
Níquel (mg/L)	< 0.05	< 0.05	*
Plomo (mg/L)	< 0.05 LD	< 0.05 LD	*
Potasio (mg/L)	6.18 ± 0.42	16.54 ± 1.12	-
Sodio (mg/L)	5.05 ± 0.41	12.59 ± 1.02	-
Turbidez (NTU)	5.60	7.80	-

*LD: Límite de Detección. *Valores fuera de rango. -Sin remoción*

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Se observó la remoción de calcio, hierro y nitrógeno amoniacal del medio con un porcentaje de remoción del 12.5%, 76.71% y 12.05%, respectivamente. Del cobre, potasio y sodio se observó un incremento de concentración; y del cromo, molibdeno, níquel y plomo no fue posible medir porcentaje de remoción porque las concentraciones estuvieron fuera del rango (menores a 0.01, 0.04, 0.05 y 0.05 mg/L, respectivamente).

3.4 Extracciones de lípidos

3.4.1 Extracción de Lípidos Totales

De acuerdo con los lípidos extraídos por los solventes metanol, etanol, cloroformo: metanol (1:2), acetato de etilo, metilciclohexano y hexano; probados en biomasa seca y biomasa húmeda obtenida de *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola, se obtuvo una producción total de lípidos de 0.0127 g/L/d y una productividad específica de 0.027 d⁻¹, siendo el mejor solvente extractor para lípidos la mezcla cloroformo: metanol (1:2), obteniendo cerca del 23.01% de lípidos (Figura 10), con una producción de 0.292 g/L/d. El segundo mejor solvente fue hexano, con 12.39% de lípidos y una producción de 0.157 g/L/d. Los solventes que le siguen son acetato de etilo con un 11.85% y una producción lipídica de 0.151 g/L/d y metilciclohexano con un 10.67% de lípidos y productividad de 0.136 g/L/d. No se observó buena extracción de lípidos con metanol (7.53% y 0.096 g/L/d) y etanol (8.73% y 0.111 g/L/d). Además, se observa que al realizar la extracción con biomasa seca se obtiene mayores resultados a comparación con biomasa húmeda, la que presenta valores bajo el 2 % de lípidos siendo acetato de etilo el mejor extractor con 2.12% y una productividad del 0.027 g/L/d. El segundo mejor solvente fue el hexano que obtuvo 2% de lípidos con una productividad del 0.026 g/L/d, cloroformo: metanol (1:2) y metilciclohexano le siguen con

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

un porcentaje de 1.88, 1.81 % y una productividad del 0.024 y 0.023 g/L/d respectivamente. Finalmente, etanol y metanol obtuvieron los porcentajes más bajos de la extracción con 1.53 y 1.40% y una productividad de 0.020 y 0.018 g/L/d.

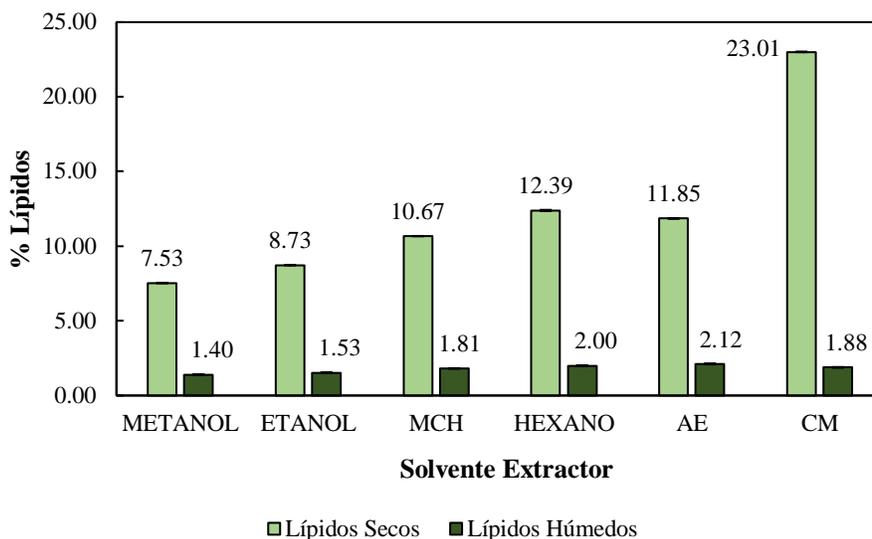


Figura 10. Extracción de lípidos en biomasa seca y húmeda de *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola. En el eje de las ordenas se presenta el porcentaje de lípidos secos extraídos y en el eje de las abscisas se colocan los solventes extractores. Metilciclohexano (MCH), acetato de etilo (AE) y cloroformo: metanol (1:2) CM. Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

3.4.2 Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL)

En la Figura 11 puede observarse los resultados de la extracción de ácidos grasos libres. El mejor solvente extractor fue acetato de etilo con un porcentaje de AGL del 46.41% en biomasa seca, seguido de la mezcla cloroformo: metanol (1:2) con 43.34%; hexano extrajo cerca de 38.95% de ácidos grasos. Para el solvente de metilciclohexano se obtuvo un porcentaje del 29.83% y para metanol y etanol la extracción fue muy baja, llegando a un porcentaje de extracción del 1.32% y 0.71%, respectivamente.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

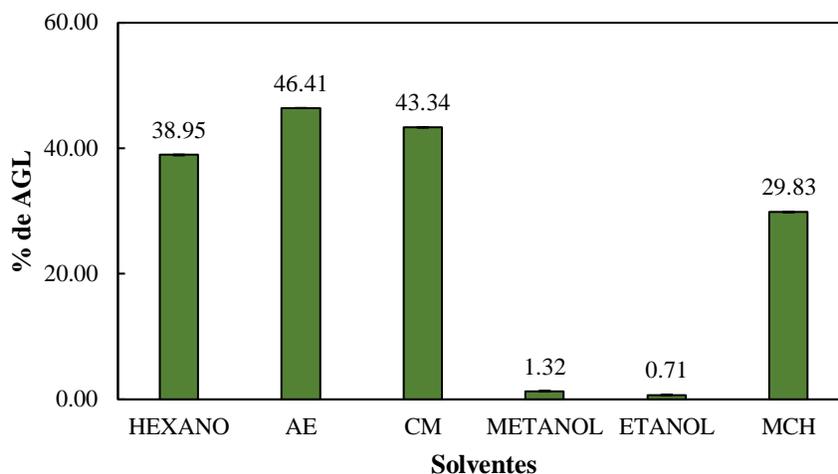


Figura 11. Extracción de Ácidos Grasos Libres en biomasa seca de *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola. En el eje de las ordenadas se presenta el porcentaje de AGL y en el eje de las abscisas se colocan los solventes extractores. Metilciclohexano (MCH), acetato de etilo (AE) y cloroformo: metanol (1:2) (CM). Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

3.4.3 Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME)

Para la extracción de FAME directo empleando biomasa seca sin solvente extractor se obtuvo que con ayuda del catalizador ácido la extracción superó el 70.33% de FAME en comparación del catalizador con resina que logró un 14.62%. Para la extracción de FAME indirecto con biomasa seca se observó que el ácido sulfúrico obtuvo mayor cantidad de porcentaje a comparación de la resina comercial (Figura 12). La mezcla cloroformo: metanol (1:2) extrajo 69.15%, siendo el mejor solvente en este proceso, seguido de hexano con 61.35% y como tercer mejor solvente el acetato de etilo (AE) con 48.65%; el MCH, etanol y metanol registraron valores bajos de extracción 34.90%, 19.05% y 17.35% respectivamente. Referente a la resina, el cloroformo: metanol (1:2) fue el solvente con mayor porcentaje de remoción llegando hasta 8.70% seguido del hexano con 6% y los demás solventes bajo un porcentaje de 2%.

FAME indirecto con biomasa húmeda presentó buenos resultados con ayuda del catalizador ácido a diferencia de la resina, en donde se identificó que el mejor solvente fue

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

CM con una extracción total de 63.5% seguido de hexano y AE con 58.25 y 52.65%; se reflejó una extracción de 39.45% con MCH y etanol y metanol extrajeron FAME cerca del 20%. La resina, en este caso, mostró una extracción del 16.75% con AE, seguida de CM con un 15.4% y hexano con un 8.15%, los demás solventes estuvieron a bajo del 3.8%.

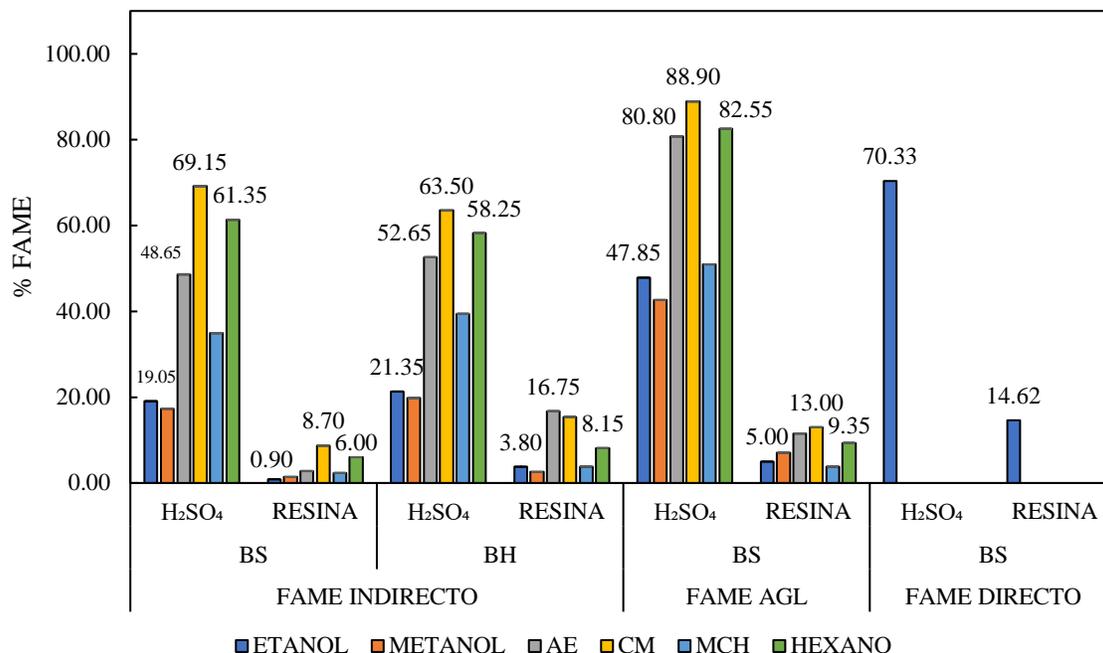


Figura 12. Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME) de *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola. En el eje de las ordenadas se presenta el porcentaje de FAME y en el eje de las abscisas se colocan los solventes extractores. MCH metilciclohexano, AE acetato de etilo y CM cloroformo: metanol (1:2). Resina comercial CT-269DR. Los resultados se expresan como el promedio de triplicados y su desviación estándar.

Los resultados obtenidos con FAME AGL muestran que al emplear biomasa seca con ácido sulfúrico se obtuvo mayor porcentaje de extracción. En este contexto, CM extrajo 88.9% de FAME, como segundo solvente se observa a hexano con 82.55% y AE con un 80.80%. Para el etanol y metanol se reportaron valores de 47.85% y 42.65%, respectivamente. Con la resina se observó el mismo comportamiento, en el cual el mejor solvente se registra con CM con 13%, seguido de AE con 11.55% y hexano con 9.35%. Para MCH, etanol y metanol se obtuvieron valores menores de 7%. Se obtuvo un valor de $p < 0.05$,

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

lo que comprueba que no existen valores significativos en los FAME obtenidos con ácido sulfúrico.

3.5 Cromatografía de capa fina (Thin layer chromatography-TLC)

Los resultados obtenidos en la TLC se muestran en la Figura 13, donde se aprecia la corrida de las muestras tanto del estándar correspondiente a un éster de colesterol como de una muestra de ácidos grasos libres obtenida de la extracción de AGL con cloroformo: metanol (1:2) mencionada en el apartado 3.4.2; seguida de una muestra con FAMES AGL con ácido sulfúrico como catalizador y cloroformo: metanol (1:2) como solvente extractor.

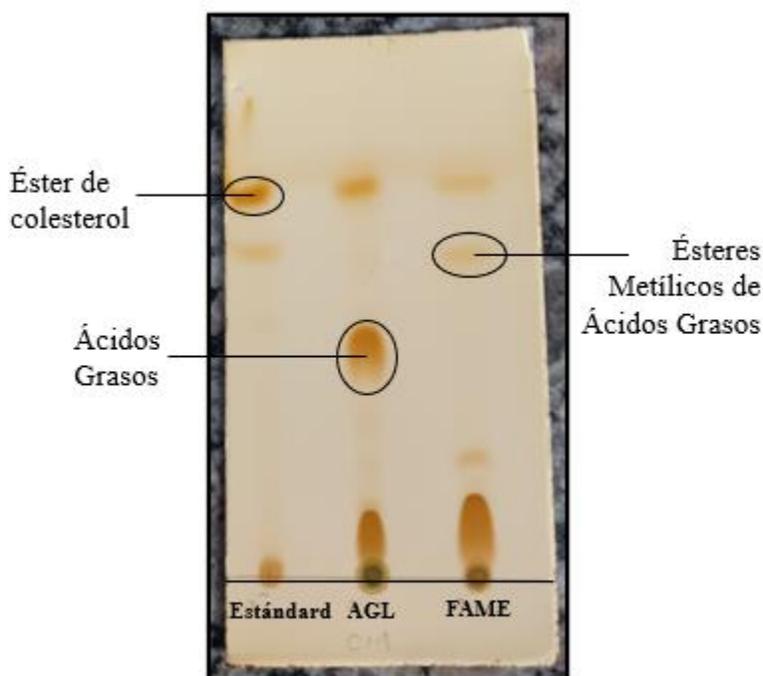


Figura 13. TLC de AGL y FAME obtenidos a partir de *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola. AGL: Ácidos Grasos Libres, FAME: Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos.

En la placa de gel de sílice con cloroformo: metanol (1:2) como fase móvil se observó que las muestras colocadas recorrieron diferentes distancias, las cuales se especifican en la

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Tabla 4, siendo posible su identificación a través de una comparación bibliográfica con el factor de retención de cada muestra.

Tabla 4. Factor de Retención de AGL y FAME obtenido con *C. vulgaris* en agua residual acuícola

Muestra	X (cm)	Y (cm)	R_f
Estándar	6	4.8	0,77
AGL	6	2.7	0,45
FAME	6	4.1	0,68

Nota. R_f: Factor de retención. X: distancia total. Y: distancia recorrida por la muestra.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Chlorella vulgaris cultivada en un ambiente acuático requiere de varios factores como temperatura, pH, nutrientes, fuente lumínica, entre otros, que garanticen su óptimo crecimiento y desarrollo (Ramos & Pizarro, 2018). En este estudio se observó que el crecimiento celular de *C. vulgaris* tuvo mejor resultado al ser cultivada en agua residual acuícola en comparación de los resultados obtenidos con el control en medio BBM. Este aumento de crecimiento microalgal se observó también en la investigación de Caporgno (2015) y Singh (2017), donde analizaron el comportamiento de *Chlorella* cultivada en aguas residuales urbanas. El ligero incremento de biomasa microalgal en agua residual se debe principalmente a la gran disponibilidad de nutrientes que le brinda el medio acuícola. En la Figura 14, se observa una comparación entre nutrientes presentes en los dos medios. Según Suthar & Verma (2018) las aguas residuales presentan una alta carga orgánica, especialmente de DBO, y una fuerte disponibilidad de macronutrientes esenciales como nitrógeno y fósforo inorgánico los cuales son asimilados y empleados para la producción de fosfolípidos, ATP

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

y ácidos nucleicos contribuyendo al incremento de su índice másico (Singh et al., 2017), este aspecto convierte al agua residual acuícola en un medio de crecimiento adecuado para microalgas sin necesidad de recurrir a medios comerciales o suplementos nutricionales. De acuerdo con lo expuesto, la carga de nutrientes del agua residual supera en mayor proporción a la presente en el medio BBM, especialmente en nitrógeno, fósforo y DBO categorizados como factores limitantes en la biomasa microalgal, además de la fuente de carbono y la intensidad de luz (Cho et al., 2016).

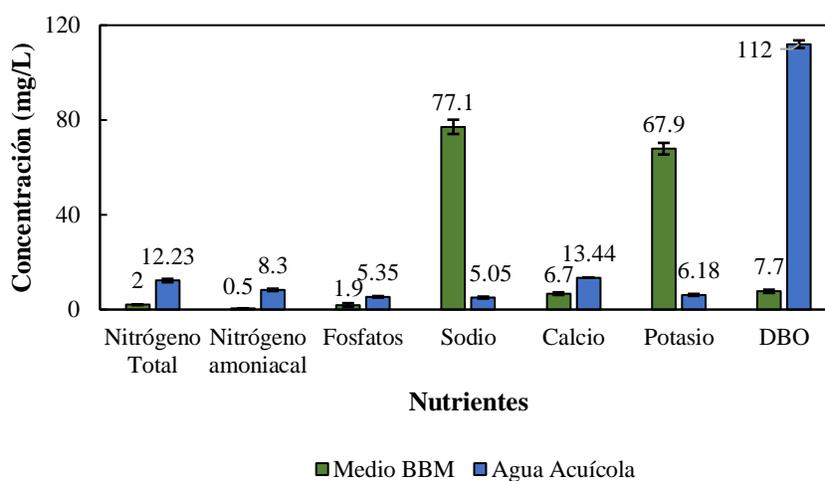


Figura 14. Comparación de nutrientes entre medio BBM y Agua residual acuícola. En el eje de las ordenas se presenta la concentración en mg por litro y en el eje de las abscisas se colocan los nutrientes. Valores del medio BBM fueron obtenidos de la investigación de (Eladel et al., 2019).

Entre las pruebas realizadas para la determinación del crecimiento celular, se observó que la concentración microalgal en el agua residual fue similar a la obtenida en el control. En la prueba de conteo celular, *C. vulgaris* cultivada en el agua residual acuícola presentó un comportamiento similar al manifestado por de Oliveira (2020) que analizó el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en agua residual de tilapia del Nilo. Se identificó un fase de adaptación para *C. vulgaris* en agua residual comprendida entre los días 0 y 4 con una concentración de $1.34 \cdot 10^6$ cel/mL, mientras que de Oliveira (2020) obtuvo en el mismo rango de días una

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

concentración de $4 \cdot 10^6$ cel/mL; esto se debió a que el autor fortificó el agua residual con 50% de medio BBM suministrando mayor cantidad de nutrientes. Lam & Lee (2012) en su trabajo determinaron que *C. vulgaris* cuando es cultivada al aire libre en un medio proveniente de agua residual es capaz de disminuir su fase de adaptación a un rango entre 1 a 3 días al contrario de un medio con agua fresca obteniendo una concentración mayor de biomasa. La fase exponencial se mostró entre los días 4 a 7 en un tiempo de cultivo semejante a la descrita por Hadrich (2018) en su cultivo de *Chlorella* sp. para la producción de lípidos, en donde destacó una fase exponencial entre los días 3 a 6. El adelanto de fases se debió probablemente a que el medio de cultivo suministrado fue comercial y *Chlorella* no requiere un periodo de adaptación tan largo. Además, el tiempo de cultivo se alargó por 22 días a comparación de los 12 días como se presenta en esta investigación con el agua acuícola.

La mayor concentración de células se obtuvo en el día 9 con $3.55 \cdot 10^6$ cel/mL; Ramos & Pizarro (2018), sugirieron que la microalga puede crecer hasta el día 8 en agua residual de cultivo del pez limón alcanzando una concentración superior a $2 \cdot 10^7$ cel/mL en su cultivo con una exposición a la intemperie durante 10 días. *C. vulgaris* alcanzó una fase estacionaria entre los días 8 a 10 con una concentración de $3.48 \cdot 10^6$ cel/mL, mientras que Eladel (2019) indicó que *C. sorokiniana* cultivada en aguas residuales municipales tuvo una concentración mayor a $8 \cdot 10^7$ cel/mL en esta misma fase; esto se debió probablemente al volumen total de cultivo, siendo este de 5 litros, volumen que facilita la asimilación de nutrientes y la absorción de luz por parte de la microalga (Suthar & Verma, 2018). De igual manera, Usha (2021) menciona en su investigación que obtuvo una concentración de $4.32 \cdot 10^6$ cel/mL con el tratamiento 3 con una mezcla entre agua residual (50% w/w) y medio Conway (50% w/w), alcanzando *C. vulgaris* su fase estacionaria en un cultivo de 6 días. A partir del día 10 *C.*

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

vulgaris empezó su muerte celular como lo describe también Frumento (2013), especificando que un cultivo batch debe mantenerse hasta 15 días, lapso en el que el medio es capaz de proveer nutrientes a las microalgas.

Con respecto a las pruebas realizadas de peso seco y densidad óptica se obtuvieron valores ligeramente mayores de concentración celular en agua acuícola con respecto al BBM. Si bien, la concentración microalgal obtenida se mostró similar entre los dos medios, esta discrepancia pudo haberse dado por ciertos factores como la turbidez del agua en la densidad óptica. En la Tabla 3 se registra un valor promedio de turbidez inicial y final de 6.7 NTU, valor semejante al estudiado por Teixeira (2021) en aguas usadas en la acuicultura, este valor elevado de turbidez afectaría directamente a la absorción de luz de la muestra en el espectrofotómetro (Chatla et al., 2020) provocando que los resultados sean mayores. Esta técnica no es tan sensible ni reproducible para determinar el valor verídico de la concentración celular de *C. vulgaris* (BioSense, 2017). Además, la prueba de peso seco puede verse afectada negativamente por factores como la presencia de sólidos suspendidos, células muertas, sedimentos o material orgánico como alimento o heces de peces, volatilidad de compuestos internos celulares, entre otros (Chatla et al., 2020), que se encuentren presentes en el fotobiorreactor a causa del agua residual, observación que no se aprecia en el cultivo con BBM ya que este no presenta tales características (Sánchez & Martínez, 2012). Según Chioccioli (2014) el peso seco, si bien no es eficiente para determinar la composición de la biomasa, es efectivo para registrar la conversión de macronutrientes como C, N y P en biomasa orgánica.

Es importante mencionar que cada investigación presentó medios de cultivos y condiciones de cultivos diferentes y esto afecta directamente la biomasa y las

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

productividades; por lo que no pueden hacerse comparaciones directas de los resultados. Aquí solo se comparará la productividad específica. En este sentido, de acuerdo con la productividad obtenida en la Tabla 1, el cultivo en agua residual acuícola presentó una productividad volumétrica de 0.039 g/L/d, valor semejante al obtenido por Illman (2000), quien reporta una productividad volumétrica de 0.03 - 0.04 g/L/d siendo *C. vulgaris* cultivada de forma fotótrofa con CO₂ como fuente de carbono. Además, la productividad específica obtenida por los 40 litros de cultivo fue de 0.083 d⁻¹, similar a la obtenida por Nayak (2011) y sus investigadores de 0.0744 d⁻¹ en la India con distintas cepas de *Chlorella* para la producción de biodiesel.

En la Figura 3, se observó a *C. vulgaris* al inicio y al final del cultivo en agua residual acuícola en donde se identificó un cambio de color de la microalga de verde brillante a amarillo verdoso. Según Safi (2014) en su revisión sobre la morfología y producción de *C. vulgaris*, menciona que este cambio de color se debe a que la clorofila, uno de los pigmentos más abundantes dentro de los tilacoides microalgales encargados de captar la luz para transferirla al fotosistema, se degrada a feofitinas que son moléculas de clorofila que han perdido sus iones de Mg⁺². Esta acción sucede durante el crecimiento microalgal o en condiciones extremas de radiación o pH (Chioccioli et al., 2014).

Como se ha comentado anteriormente, las aguas residuales presentan altas concentraciones de DBO, DQO, proteínas, lípidos, compuestos inorgánicos como potasio, calcio y demás metales pesados (Mubashar et al., 2020) que requieren ser degradados para no provocar contaminación en aguas naturales. Varios estudios corroboran que las microalgas, en especial *C. vulgaris*, tienen un gran potencial de eliminación de nitrógeno y fósforo presente en el medio de cultivo ya que utilizan estos compuestos químicos para

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

realizar sus actividades metabólicas y son capaces de almacenarlos en sus estructuras celulares para emplearlos en la síntesis de proteínas, lípidos y ATP. De este modo, las aguas eutrofizadas que contienen grandes concentraciones de nitrógeno y fósforo son una excelente fuente de nutrientes para las microalgas (Zeng et al., 2015).

La asimilación de nitrógeno por parte de *Chlorella vulgaris* se da gracias a la intervención de nitrato reductasa (en el citoplasma) y nitrito reductasa (en el cloroplasto) obteniendo moléculas reducidas de nitrato a nitrito y finalmente a amonio que ingresa al ciclo GS/GOGAT obteniendo moléculas de glutamato (Pozzobon et al., 2021), compuesto esencial que proporciona las bases carbónicas en la biosíntesis de aminoácidos y subsecuentemente interviene en el ciclo de Krebs oxidando el poder reductor (Fidalgo, 1995). Se ha establecido que la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo para *C. vulgaris* es dependiente a la cantidad de biomasa obtenida al final del cultivo (C. Y. Chen et al., 2011; Tejido-Nuñez et al., 2019), ya que altas concentraciones de nitrógeno pueden ocasionar un efecto tóxico asociado al incremento de la actividad de nitrato reductasa acumulando compuestos nitrogenados como nitrito y amoniaco en las células disminuyendo por consiguiente la producción celular. Por el contrario, concentraciones óptimas de nitrógeno permite que sea utilizado como bloque de construcción para metabolitos sintetizados por la microalga esta disponibilidad propone una proliferación de biomasa microalgal provocada por cambios fisiológicos a la especie vegetal (Suthar & Verma, 2018). Se observó en la Tabla 2 una remoción del 96.34% de nitrógeno total, valor semejante al expuesto por Acién et al., (2016) quien obtuvo una remoción cercana al 96% usando *Chlorella* sp. en aguas residuales de drenaje primario, mientras que Singh (2017) obtuvo una remoción total de N del 87.9% en una dilución del 30% entre agua residual urbana y agua destilada. Se observó, además, que

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

en el día 4 el porcentaje de remoción alcanzaba entre 70 y el 90% de remoción, datos semejantes a los obtenidos por Elichkova (2014). Este porcentaje permitió obtener una concentración final de 11.47 ± 0.70 mg/L de nitrógeno apta para ser vertida en corrientes de agua según los límites permisibles presentados en el Anexo 1. Además, se ha determinado que el rango máximo de N para no presentar riesgos de toxicidad celular se encuentra en 150 mg/L, convirtiendo al nitrógeno como factor limitante de crecimiento celular según Suthar & Verma (2018), en la investigación presente *C. vulgaris* fue capaz de tolerar concentraciones superiores a 300 mg/L removiendo eficientemente, esto probablemente debido a que tanto la tasa de crecimiento como la concentración de N se encuentran correlacionadas provocando un incremento significativo en el crecimiento microalgal (Lai et al., 2011).

La concentración de fósforo se vio disminuida en el crecimiento celular principalmente por ser este uno de los compuestos fundamentales para la biosíntesis de los ácidos nucleicos y la transferencia de energía necesaria en procesos metabólicos. La principal fuente de fósforo para *C. vulgaris* está representada por las moléculas de fosfato inorgánico (Eixler et al., 2006; Fidalgo, 1995) siendo este el nutriente limitante para el crecimiento microalgal. En el agua residual se observa que la cantidad de fósforo incrementa radicalmente en el día 1 y 2, disminuyendo drásticamente en el día 3, esto se debe a que las microalgas tienen la capacidad especial de acumular fosfatos cuando el medio presenta cantidades excesivas y de liberarlos cuando hay escases del nutriente en el entorno (Fidalgo, 1995). En base a esto, se determinó que al inicio del cultivo *C. vulgaris* almacenó todas las moléculas de fósforo presentes en el agua acuícola que tuvo una concentración inicial de 120.75 ± 1.34 mg/L de PO_4^{3-} , siendo este compuesto reservado por presentar gran concentración y

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

posteriormente liberadas paulatinamente durante el ciclo de cultivo para garantizar el crecimiento microalgal y fomentar la división celular. Se reportó un porcentaje de remoción total de PO_4^{3-} del 92.19%, valor relacionado con el de Singh et al (2017), quien obtuvo una remoción del 93.4% diluyendo su agua residual urbana con 10% de agua destilada y mucho mayor al reportado por Kwon (2020) con porcentajes entre 41 a 62.5% en aguas residuales crudas y digeridas por cerdos.

González (2014) menciona en su estudio sobre fosfatos presentes en aguas agrícolas que la disminución del oxígeno disuelto causa un aumento del fósforo debido a la disolución de un ion fosfato que se reduce y es posteriormente absorbido por óxidos metálicos o materia orgánica en descomposición razón por la cual seguramente hubo un incremento de fósforo en el día 1 y 2 para posteriormente ser eliminado.

En esta investigación la microalga fue cultivada de forma fotoautótrofa cuya principal fuente de carbono inorgánico fue CO_2 suministrado por el ambiente debido a su fácil difusión en el interior celular garantizando el proceso de su fijación. Para *C. vulgaris* la asimilación de carbono se da a través de la anhidrasa carbónica encontrada en forma intracelular en el cloroplasto, la cual asimila la molécula de CO_2 convirtiéndola en bicarbonato (HCO_3^-) por medio del transporte activo celular, liberando moléculas de oxígeno al medio (Fidalgo, 1995; You et al., 2020). Se observó que la concentración de carbono inicial en el agua acuícola fue de 792 ± 5.66 mg/L, carbono que se encontraba disuelto en el medio, según Pourjamshidian (2019) la concentración de carbono debe ser mayor a 1 mM para tener una buena tasa de crecimiento y producir una tasa fotosintética más alta ya que el carbono promueve la fotosíntesis en *C. vulgaris*, esto otorgaría un aumento del 27% en la productividad de biomasa y un 7.7% en el biodiésel (Micán & Chaparro, 2020). Además, Pourjamshidian (2019)

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

sugiere un aumento de la concentración de lípidos con la adición de bicarbonato o carbonato como suministro de CO₂.

C. vulgaris alcanzó una remoción total de C del 92.19%, un tanto menor a la referida por Tejido-Nuñez (2019) que obtuvo una eficiencia de remoción del 99.7% esto debido probablemente al pretratamiento brindado al agua residual y por la prolongación del tiempo de cultivo hasta los 18 días. Además, se ha determinado que *Chlorella* sp. requiere de C, N, P en proporción 100/14/2 para su correcto crecimiento (Acién et al., 2016). De esta forma, y observando los resultados obtenidos se puede determinar que el agua residual acuícola aportó con una relación de 79.2/26/2.6 respectivamente; el buen crecimiento de *C. vulgaris* se amerita a lo mencionado por Kwon (2020) y Li (2020) quienes destacaron la importancia de que las aguas residuales presenten altas concentraciones de DQO favoreciendo al crecimiento microalgal evitando fases de retraso y a la par incrementando el porcentaje de remoción de nutrientes si la cantidad de amoníaco es la correcta en el medio. Se ha comprobado que *Chlorella* puede crecer perfectamente de forma mixótrofa (Feng et al., 2011) utilizando fuente de carbono el CO₂ del ambiente y el carbono orgánico presente en el medio de forma simultáneamente. En este caso, observando la concentración de DQO de 250 mg/L favorece de manera significativa el incremento de la masa microalga. La concentración entre N/P del agua residual presentada fue desproporcional a la sugerida por Acién (2016), pero en concentraciones mayores entre N y P, convirtiendo a este último en el nutriente limitante. Caporgno (2015) mencionó que a pesar de que exista un desequilibrio entre dicha relación *C. vulgaris* es capaz de crecer sin impedimentos, reportando incluso porcentajes mayores de remoción.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

En la Tabla 3 se observó la remoción total de ciertos nutrientes analizados tanto en el agua residual acuícola inicial (antes de la inoculación con *C. vulgaris*) y final (sobrenadante restante sin microalga). El calcio tuvo una remoción total del 12.5%, este elemento atribuye funciones indispensables para *C. vulgaris* en su pared celular y un requerimiento especial para ciertas ATPasas y enzimas microalgales dependientes de Ca⁺ (Fidalgo, 1995). Vandamme (2012) en su estudio sobre el rol del calcio y magnesio en la floculación de *C. vulgaris*, determinó que a lo largo del cultivo de microalgas en pH alto las sales de calcio y magnesio se van precipitando en el medio provocando su desasimilación. Sin embargo, en concentraciones mayores a 2.5 mM, se mantiene el pH bajo y el calcio se precipita en carbonato de calcio, sal de calcio y fosfato de calcio (Acién et al., 2016) sin producir autofloculación. En la Tabla 3 se indica la concentración final de calcio en el agua acuícola con 11.76 mg/L (2.94 mM) concentración mayor a la mencionada por Vandamme (2012), lo que seguramente impidió mayor remoción por parte de la microalga. Zhu (2016) menciona que una buena concentración de calcio en el medio promueve el flujo electrónico cíclico que es regulado precisamente por este elemento aumentando, de esta manera, la producción masiva de ATP utilizada en la síntesis de lípidos.

El cobre, por su parte, es uno de los metales pesados que afecta negativamente el crecimiento microalgal en altas concentraciones ya que puede impedir el proceso de la fotosíntesis y causar modificaciones en la pared celular de la microalga cuando se encuentra en concentraciones mayores a 2 mg/L (Acién et al., 2016), pero en bajas concentraciones representa una ayuda funcional para que *C. vulgaris* ponga en marcha su sistema de transporte de electrones y, además, sirve como cofactor de ciertas enzimas (Fidalgo, 1995). Se observó un incremento en la concentración del cobre que va de <0.01 a 0.45 mg/L, este

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

aumento de concentración, según Chen (2016) se produce por concentraciones mayores a 3 μM que causan daños al fotosistema II encargado de la fotosíntesis en la microalga, esto inicia un proceso de autoprotección inhibiendo los sitios de unión entre el cobre y la membrana microalgal (Pätsikkä et al., 2002) y se ha comprobado que a pH 6.2 solo el 34.4% de cobre se encuentra en forma iónica y lo demás en solución o precipitados. La falta de remoción pudo haberse dado, de acuerdo con Al-Rub (2006), por el pH ya que en su investigación destacó que la mejor absorción de cobre fue en pH 4-5 debido al aumento de ligandos y la unión con grupos carboxilo entre las algas y el metal, aumentando las cargas negativas sobre la superficie celular sin despreciar la carga electrostática entre los iones de cobre y corrobora que a pH fisiológico no se registró mayor remoción. Mubashar (2020) estableció una eficiencia de remoción del 32 al 45% por parte de *C. vulgaris* en aguas residuales.

El cromo por su parte se mantuvo en valores fuera de rango, lo que indica concentraciones mínimas de este metal, en investigaciones sobre la capacidad de *C. vulgaris* para remover metales pesados se ha identificado una eficiencia cercana al 58% (Mubashar et al., 2020), pero esto no se pudo corroborar en este estudio. Por su parte, el hierro es un cofactor indispensable para varios sistemas enzimáticos, del citocromo y de la proteína redox del Fe^+ utilizada para el crecimiento de la microalga. *C. vulgaris* en agua residual acuícola presentó un porcentaje de remoción del 76.71% (Tabla 3) valor mayor a los citados por Wang (2022) con *Chlorella pyrenoidosa* cultivada en agua con un 49.64%. Además, Liu (2008), afirmó la relación existente entre un alto contenido de hierro y la limitación de nitrógeno para la alta productividad lipídica de *Chlorella*. El molibdeno, por otra parte, es un elemento esencial para la nitrato reductasa, enzima encargada de la reducción del nitrato a nitrito. Este

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

elemento es asimilado por la microalga garantizando su crecimiento (Vega et al., 1971); en este estudio no se pudo registrar el porcentaje de remoción con respecto al molibdeno.

Según Wang (2019), el nitrógeno amoniacal representa una de las fuentes más eficientes para la captación de nitrógeno por parte de *Chlorella vulgaris*; sin embargo, es letal en altas concentraciones, especialmente en forma de NH_3 . En la Tabla 3 se observa un porcentaje de remoción del 12.05%, más bajo que el mencionado por Choi & Lee (2013) con un 22.99%. Cuando la tasa de asimilación de CO_2 en el cultivo es mayor a la tasa de disolución, esto provoca una deficiencia de fuente de carbono y la microalga adopta al bicarbonato presente en el medio como donador de carbono provocando un incremento de sodio y potasio, y consecuentemente, una alcalinización del medio (Wang et al., 2019). Este efecto se observa en el incremento de concentración de K y Na en la Tabla 3.

Con respecto al níquel, otro compuesto que en concentraciones elevadas causa gran daño a las microalgas, pero es necesario para aquellas que metabolizan urea en el medio. En una investigación similar se determinó una remoción del 25.58% de níquel con *Chlorella sorokiniana* (Akhtar et al., 2004), sin embargo, no se pudo establecer grados de remoción en esta investigación. El plomo, por otro lado, en concentraciones mayores a $5 \mu\text{mol/L}$ causa una disminución radical al crecimiento celular e incrementa el estrés inhibitor en el proceso de la fotosíntesis a causa de la destrucción de la clorofila (Hee et al., 2021).

Según con lo expuesto, la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes al Recurso de Agua en la revisión del anexo 1 del libro IV del texto unificado de legislación secundaria del MAE, estipula que las aguas residuales de origen acuícola forman parte del apartado 2 correspondiente al “criterio de calidad para la preservación de la vida acuática y

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

silvestre en aguas dulces frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuarios” (MAE, 2015, p. 9). En dicha norma se sientan las bases en respuesta a criterios de calidad admisibles para verter agua residual acuícola en distintos cuerpos de agua, como se observa en el Anexo 1. Según estos parámetros el agua obtenida después de cultivo cumple con los límites permisibles presentados por el ministerio del ambiente, agua y transición ecológica, lo que asegura una buena remoción por parte de *C. vulgaris* garantizando la eliminación de cualquier nutriente o metal pesado que pueda provocar contaminación o eutrofización a fuentes de agua naturales.

Se mencionó anteriormente la necesidad de probar diferentes solventes para encontrar aquel que sea más eficiente a la hora de extraer los compuestos de interés, según Sánchez-Bayo (2020), el solvente orgánico no polar ingresa en a través de la membrana celular de *C. vulgaris* dirigiéndose hasta el citoplasma, lugar en donde se encuentran con los lípidos microalgales y gracias a la interacción entre fuerzas Van der Waals (Valchev et al., 2017), los lípidos neutros forman un complejo con el solvente siendo difundidos a través de la membrana. Sin embargo, la polaridad del solvente juega un papel fundamental en esta extracción, ya que a mayor polaridad del solvente mayor extracción de lípidos, pero con lípidos no polares como ácidos grasos libres y lípidos neutros pueden ser disueltos en solventes con menor polaridad como MCH (Angles et al., 2017; Park et al., 2017).

Según los resultados obtenidos, el mejor solvente extractor de lípidos totales por mecanismos de disrupción celular con ultrasonido fue cloroformo: metanol en concentración (1:2) aplicado a biomasa previamente secada a 100 °C, obteniendo 23.01% de lípidos totales a 10 °C durante 45 minutos semejante al porcentaje obtenido por Hadrach (2018), quien reportó 22.6% de lípidos totales extraídos con cloroformo: metanol, pero con una

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

concentración (2:1) usando ultrasonido a una temperatura de 60 °C por 18 minutos. En este caso, Hadrich (2018) menciona que existe mayor respuesta en obtención de lípidos cuando se aplica una temperatura de 60 °C y una concentración de CM (2:1) durante 30 minutos, este ligero incremento porcentual posiblemente se deba porque el autor utilizó 4 mL del solvente, a comparación de este estudio que se utilizó 20 mL de solvente. Es decir, 5 veces más de CM en relación (2:1) por lo que se incrementó en un 0.41% de lípidos. Sin embargo, esta extracción proporcionó rango de porcentajes de lípidos semejantes a los cultivados en BBM, como lo menciona Pérez (2018) y Feng (2011) que reportan un intervalo de 20 a 30% de lípidos obtenidos con biomasa seca y control de nutrientes con un medio de cultivo comercial. Nayak (2011) por su parte, obtuvo 22.7% de lípidos extraídos, de igual manera, con CM (2:1). Se observó una productividad total de lípidos de 0.0127g/L/d muy semejante a la obtenida por Singh (2017) en agua residual municipales con 0.0143 ± 0.0038 g/L/d. Además, recalca que la productividad obtenida en un cultivo con medio BBM fue de 0.0124 g/L/d, lo que genera una productividad de 1.03 veces mayor a la mostrada por Singh (2017) en medio BBM. Según el autor este incremento de productividad es consecuencia del alto contenido de fósforo y nitrógeno en conjunto con la excelente capacidad que tiene *Chlorella vulgaris* de reducción de nutrientes en efluentes residuales provocando un aumento de biomasa microalgal de forma simultánea con la producción lipídica y de ácidos grasos para la obtención de biodiesel. De esta manera se aprueba la hipótesis planteada obteniendo al menos 20% de lípidos con CM. Adicionalmente, se ha comprobado que el tipo de disrupción celular juega un papel fundamental para la buena extracción de lípidos y genera una mayor pureza en el producto, de acuerdo con Davoodbasha (2021), por lo que se corrobora su efectividad en este trabajo. Sin embargo, si no se cuida el tiempo de sonicación se puede

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

incurrir en la producción de radicales libres alterando la calidad del biodiesel (Kumar et al., 2015).

El segundo mejor solvente fue el hexano alcanzando un porcentaje lipídico del 12.39%, resultado similar presentado por Amarni & Kadi (2010) quienes estudiaron la extracción de aceite de oliva bajo variaciones de tiempo, potencia y temperatura con hexano alcanzando un 17.7% de producto en 2 minutos con 720W a 30 °C. Cheng (2011) por su parte obtuvo 13.8% de lípidos con ayuda de hexano en biomasa microalgal de *Pavlova sp.* El porcentaje de lípidos obtenidos con MCH y AE son bajos en comparación con los reportados por Park (2017).

Uno de los resultados que llamaron más la atención fue el arrojado por la biomasa húmeda, la cual no superó la extracción de lípidos más allá del 2.12% con hexano y AE, según Chioccioli (2014) asegura que en un principio es imposible calcular el biovolumen de biomasa seca en biomasa húmeda ya que no se puede estimar la cantidad de biomasa húmeda a partir del peso seco, alterando desde un inicio la cantidad de biomasa presente en la extracción. Por otro lado, Sánchez-Bayo (2020) sugiere que al trabajar con biomasa húmeda, el agua se convierte en una gran barrera impidiendo la penetración del solvente a la membrana celular y la posterior liberación del lípido. Por estas razones se observó un porcentaje reducido de lípidos en biomasa húmeda a comparación de la seca.

Con respecto a la obtención de ácidos grasos libres, se observó que el acetato de etilo obtuvo mayor porcentaje de lípidos que los demás solventes, con un 46.41%, un porcentaje 1.2 veces menor al mencionado por Nayak (2011) quien obtuvo un 55.82%. De acuerdo con Park (2017), el acetato de etilo presentó mayor porcentaje debido a que tiene mayor

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

miscibilidad con los lípidos facilitando la obtención de los ácidos grasos. Por otra parte, se observó que el CM y el hexano tuvieron porcentaje similares de obtención de ácidos grasos. Comparando con otras investigaciones, se observó que Zheng (2012) obtuvo 81.06% de ácidos grasos insaturados en un cultivo de *C. vulgaris* aireado y sometido a hidrólisis enzimática, la extracción se llevó a cabo con hexano-metanol (1:1), Zheng asegura que el factor que promovió el porcentaje tan alto de ácidos grasos fue las enzimas hidrolíticas en conjunto con la aireación que promovió la formación de insaturaciones en los ácidos grasos, obtenido AG de 14 y 20 carbonos.

Según Nayak (2011), los lípidos totales extraídos de las microalgas presentan una composición entre 50.2 a 76.1% de ácidos grasos insaturados y 19.5 a 32.6% de ácidos grasos saturados representado en su gran mayoría por C16:0 o ácido palmítico. Este autor recalca que *Chlorella* sp. se caracteriza por presentar cerca del 9.5 al 25.2% de ácido linoleico (C16:2), un ácido graso insaturado. Además, concluyó que tras su cultivo de 18 días obtuvo un porcentaje lipídico por célula del 28.3% en fotobiorreactor a comparación del 14% obtenido en un matraz con agitación incrementado el rendimiento de lípidos el doble.

Siguiendo este contexto, Davoodbasha (2021) y Sharma (2016) comentaron que el biodiesel obtenido de *Chlorella vulgaris* cultivada en medio comercial en la India presentó alrededor de 33.53% de ácidos grasos saturados (SFA), una cantidad cercana a los 28.58% correspondiente a MUFA (ácidos grasos monoinsaturados) y 37.12% de (PUFA) ácidos grasos poliinsaturados. Además, se ha establecido que la calidad del biodiesel está relacionada con un alto porcentaje de SFA y MUFA, siendo los ácidos grasos de cadena corta entre 16 a 18 carbonos como el ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1), palmitoleico (C16:1) y mirístico (C14) los más recomendables para la mezcla de biodiesel microalgal. Sin

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

embargo, con los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye que la hipótesis planteada con miras a la obtención mayor del 80% de AGL no se cumplió.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos producidos por *C. vulgaris* en agua residual acuícola presentaron una mejor extracción con H_2SO_4 a comparación de la resina CT-269DR esto debió a que ciertos autores reportan que el ácido no se ve afectado negativamente por la presencia de ácidos grasos libres, a comparación de los catalizadores heterogéneos. De hecho, el H_2SO_4 es capaz de catalizar de forma simultánea la reacción de esterificación y transesterificación para la obtención de biodiesel. Además, los catalizadores ácidos pueden convertir fácilmente materias lipídicas con altas concentraciones de AGL (>6%), a pesar de que la reacción sea más lenta que la del catalizador heterogéneo (Vyas et al., 2010). El ácido sulfúrico como catalizador obtuvo un rendimiento total de 53.1% en el trabajo de Mathimani (2015) con una concentración de 4% del catalizador provocando que los AGL presentes en los lípidos de las microalgas se puedan esterificar por acción del ácido en mayor concentración. Además, se menciona que este catalizador es eficaz al momento de convertir triacilglicerol y AGL a FAME (Mathimani et al., 2015); por esta razón se observó una mejor producción de FAME en AGL a diferencia del proceso de FAME indirecto con CM. De esta manera se observó buen porcentaje de FAME con hexano (82.55%) y AE (80.8%). De acuerdo con estos resultados, se reprueba la hipótesis de obtener al menos 90% de FAME con *C. vulgaris* en agua acuícola.

Belkhanchi (2021) mencionó que el rendimiento de la reacción de transesterificación depende de parámetros como la temperatura, el tipo de catalizador, la relación entre reactivo y catalizador, el tiempo de reacción y el tipo de alcohol y aceite utilizado. En este caso, de acuerdo con la temperatura empleada, Belkhanchi (2021) manifiesta que obtuvo un

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

rendimiento del 98.1% a 18 °C y 91.02% a 71 °C con hidróxido de sodio como catalizador en aceite de freír utilizado de diversos orígenes, en comparación de la presente investigación que mantuvo una temperatura de 90 °C. Esto pudo haber influenciado en el rendimiento de FAME, por lo que no se alcanzó un porcentaje mayor al 80%. Además, se destaca que el tiempo de reacción ha mostrado excelentes resultados en ciertas investigaciones (Mathimani et al., 2015), demostrando que entre 1 a 2 horas la conversión a ésteres metílicos es menor reportando un rendimiento cercano al 60.31%; mientras que al mantener una reacción durante 3 horas la conversión se mantiene constante. Desfavorablemente, se menciona que un tiempo de reacción más alargado (4 horas) no tiene influencia sobre el rendimiento manteniendo 60% de rendimiento. Por esta razón, se considera que las 4 horas de reacción no fueron las óptimas para la producción de FAME ya que no mejora el rendimiento de la reacción.

Se ha estudiado la influencia de la relación entre reactivo y solvente, para los resultados expuestos se llevó a cabo una relación de catalizador/solvente/biomasa (1.74/30/10) para el H₂SO₄ y (1.1/100/1) para la resina. Mathimani (2015) en su análisis sobre catalizadores homogéneos para transesterificación con *Chlorella* sp. menciona que observó un cambio entre 2 a 3% en el rendimiento de biodiesel al utilizar más de 12 mL de metanol, obteniendo 45.22% con 12 mL y asegura que al utilizar más de este alcohol se incurrirá en gastos del proceso e interferiría con la purificación del biodiesel. Según varios investigadores aseguran que la relación óptima entre catalizador y solvente es de (1:6), es decir, con 6 veces más de solvente se ha conseguido una eficiencia del 98.1% en extracción de FAME (Belkhanchi et al., 2021). Sin embargo, Belkhanchi (2021) obtuvo un buen rendimiento empleando metanol como alcohol en la reacción, a comparación de etanol o 2-propanol, reconociendo un 98.1% de FAME con este solvente (Belkhanchi et al., 2021).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Mathimani (2015) comenta, además, que observó un efecto favorable en la agitación continua de la reacción, enfocado en dos aspectos importantes, ya que menciona que una agitación de 400 rpm apoya en la mezcla entre los lípidos hidrofóbicos y el alcohol aumentando el rendimiento de FAME y ayuda a mantener una temperatura estable en toda la reacción por lo que obtuvo un porcentaje de 46% con agitación continua durante 2 horas.

De acuerdo con trabajos relacionados, se ha establecido que el uso de catalizadores homogéneos como HCl, BF₃ o H₃PO₃ brindan mejores resultados a la hora de obtener biodiesel, es así como en el estudio de Liu (2006), Mathimani (2015) & Vyas (2010) observaron que el ácido sulfúrico obtuvo 45% de producción, porcentaje mayor a los demás ácidos, según Al-Widyan & Al-Shyoukh (2002) esto se debe a que el ácido sulfúrico cuando entra en reacción de alcoholisis con el metanol en la esterificación, este no altera la formación de los ésteres metílicos gracias a la producción de iones ácidos de hidronio por parte del H₂SO₄ y su capacidad higroscópica favorece al equilibrio de la reacción de FAME.

En base a lo mencionado por Lam & Lee (2012) en su investigación sobre el potencial de usar fertilizantes orgánicos para cultivar *C. vulgaris* para la producción de biodiesel, destaca al éster metílico del ácido palmítico, oleico y linoleico (C16:0, C18:1 y C18:2) como los principales en FAME de *C. vulgaris*, teniendo una producción del 85.6%, semejante a la presentada en esta investigación. Además, menciona que el 74% corresponde a ácidos grasos insaturados (C16:1, C16:2, C18:1, C18:2, C18:3) importantes en la producción de biocombustibles ya que son capaces de disminuir el punto de fluidez del biodiesel en temperaturas frías. Una cantidad alta de ésteres metílicos de ácidos de cadenas entre 16 a 18 carbonos garantiza un mayor número de cetano, proporcionando mayor calor de combustión (Soleimani et al., 2021).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

De acuerdo con los resultados obtenidos en la TLC, en donde se obtuvo un R_f de 0.77 para el estándar, compuesto de oleato de colesterol, según Vilardell (1971) el éster de colesterol es un lípido no polar que migrará mucho más rápido en la placa de sílica gel polar atribuyéndole un R_f mayor a los demás, (Rodríguez, 2008) en su análisis de lípidos mencionó que los lípidos no polares suelen migrar en el siguiente orden: ésteres de colesterol > triglicéridos > ácidos grasos > diglicéridos > colesterol > monoglicéridos > fosfolípidos, lo que brinda la idea de que el estándar estará en la distancia más alejada del origen, los FAME más abajo y los ácidos grasos en una posición relativamente central al punto de origen. Froehner (2007) comentó que el éster de colesterol migra generalmente a un R_f de 0.83, en la investigación presente se obtuvo un R_f de 0.77, menor al mencionado por Froehner (2007), esto pudo ser por causa del solvente que impidió que migre más rápido. Sin embargo, sigue estando en el rango para determinar de forma cualitativa las muestras. Para el ácido graso libre, Ferrari (2005) manifestó que dicho biodiesel alcanzó un R_f de 0.44 muy similar al presentado en este estudio de 0.45, lo que justifica la presencia de ácidos grasos en las extracciones realizadas. Finalmente, para la muestra de ésteres metílicos de ácidos grasos se obtuvo un R_f de 0.68. este valor fue comparado con el de Ferrari (2005) ya que mantuvo un R_f de 0.70, muy similar y en condiciones semejantes a las de este estudio. De esta manera se corrobora la presencia de biodiesel en las muestras extraídas de FAME de *C. vulgaris* cultivada en agua residual acuícola.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se caracterizó el agua residual acuícola, determinando sus parámetros fisicoquímicos y obteniendo resultados alentadores para su potencial uso como medio de cultivo para *Chlorella vulgaris*, en donde la microalga pudo crecer de forma óptima. Además, se analizó el crecimiento celular de *C. vulgaris* en un fotobiorreactor expuesto a la intemperie y pudo determinarse la eficiencia de *C. vulgaris* para la remoción de nutrientes como COT, NT, PT y de ciertos metales pesados en aguas residuales de origen acuícola, convirtiéndola en un tipo de agua que mantiene los límites permisibles establecidos por el Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica para ser vertida nuevamente a efluentes naturales sin riesgo de contaminación ni de eutrofización. Finalmente, se pudo caracterizar la fracción lipídica extraída de la biomasa microalgal obteniendo un buen porcentaje de lípidos totales extraídos con cloroformo: metanol (1:2), hexano y acetato de etilo; solventes que mostraron mayor efectividad en el proceso. Además, se obtuvieron porcentajes regulares de ácidos grasos libres y ésteres metílicos a través de las diferentes técnicas mostradas, siendo inferiores a los citados por otros autores. A pesar de que el rendimiento de AGL y FAME no fue el esperado, no se descarta su posible mejoramiento a futuro para una producción de biodiesel más eficiente.

6. RECOMENDACIONES

De acuerdo con diferentes autores, se recomienda buscar otras fuentes de carbono a parte del CO₂ que permita obtener un mejor aprovechamiento en la concentración másica,

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

como por ejemplo, el emplear bicarbonato de sodio (NaHCO_3) como fuente alternativa en microalgas fotótrofas simultáneamente con el CO_2 suministrado por el ambiente (Lam & Lee, 2012), siendo este compuesto de bajo costo en el mercado puede causar una gran diferencia. Además, existen investigaciones recientes que centran sus esfuerzos en determinar el comportamiento de las microalgas en consorcio con comunidades bacterianas, aseguran que las bacterias puede oxidar la materia orgánica en compuestos inorgánicos como dióxido de carbono, amoníaco, fosfatos; mientras que las microalgas captan la energía lumínica para su proceso de fotosíntesis y producen oxígeno a través del consumo de los compuestos inorgánicos generados por las bacterias produciendo un incremento de biomasa microalgal ayudándose unos a otros en su crecimiento (Acién et al., 2016). De esta manera, se reduciría la etapa de esterilización del agua residual abaratando costos de producción.

Algunos investigadores aseguran la efectividad de realizar transesterificación *in situ* juntando la extracción y transesterificación de lípidos y AGL en un proceso único reduciendo los costos aún más del proceso (Park et al., 2017). Además, tomar en cuenta las modificaciones en las condiciones de reacción para alcanzar estrés celular con déficit de nitrógeno para el incremento en la producción lipídica. Finalmente, probar aguas de origen acuícola de otras piscinas de cría de peces y comparar el comportamiento de la microalga de estudio.

7. RECONOCIMIENTO

Los reactivos y materiales de este trabajo fueron financiados por la DII proyecto P101617_2.2 de la Universidad Internacional SEK, Ecuador; otros materiales y equipos fueron donados por la Corporación para la Investigación Energética del Ecuador.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, B., Syed Muhammad, S. A. F. ad, Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K. A., Mahmood, A. N., & Aziz, M. M. A. (2019). Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107(February), 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.018>
- Abedini Najafabadi, H., Pazuki, G., & Vossoughi, M. (2015). Experimental study and thermodynamic modeling for purification of extracted algal lipids using an organic/aqueous two-phase system. *RSC Advances*, 5(2), 1153–1160. <https://doi.org/10.1039/c4ra11914b>
- Acién, F. G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. M., Fernández-Sevilla, J. M., & Molina-Grima, E. (2016). Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(21), 9013–9022. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>
- Adam, F., Abert-Vian, M., Peltier, G., & Chemat, F. (2012). “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. *Bioresource Technology*, 114, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.096>
- Aguilar, C., Chang, I., Tenorio, L., Ynga, G., Oscanoa, A., & Flores, L. (2011). *Determinación De La Biomasa Microalgal Potencialmente Acumuladora De Lípidos Para La Obtención De Combustible*. 1–20.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

- Ahmad, F., Khan, A., & Yasar, A. (2013). The potential of chlorella vulgaris for wastewater treatment and biodiesel production. *Pakistan Journal of Botany*, 45, 461–465.
- Akhtar, N., Iqbal, J., & Iqbal, M. (2004). Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: Characterization studies. *Journal of Hazardous Materials*, 108(1–2), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.01.002>
- Al-Rub, F. A. A., El-Naas, M. H., Ashour, I., & Al-Marzouqi, M. (2006). *Biosorption of copper on Chlorella vulgaris from single , binary and ternary metal aqueous solutions*. 41, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.018>
- Al-Widyan, M. I., & Al-Shyoukh, A. O. (2002). Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. *Bioresource Technology*, 85(3), 253–256. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00135-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00135-9)
- Alalwan, H. A., Alminshid, A. H., & Aljaafari, H. A. S. (2019). Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable Energy Focus*, 28(00), 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.ref.2018.12.006>
- Amarni, F., & Kadi, H. (2010). Kinetics study of microwave-assisted solvent extraction of oil from olive cake using hexane. Comparison with the conventional extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(2), 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.01.002>
- Angles, E., Jaouen, P., Pruvost, J., & Marchal, L. (2017). Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Algal Research, 21, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.005>

APHA. (1992). Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Practical Pharmacy Ed.)*, 18(9), 542–544. [https://doi.org/10.1016/s0095-9561\(16\)33485-5](https://doi.org/10.1016/s0095-9561(16)33485-5)

Arias, M., Martínez, A., & Cañizares, R. (2013). Biodiesel production from microalgae. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 43–68. <https://doi.org/10.1201/9781315152547-3>

Banco Mundial. (2020, March 19). *El agua residual puede generar beneficios para la gente, el medioambiente y las economías, según el Banco Mundial.*

Bastidas, O. (2011). Cell Counting with Neubauer Chamber Basic Hemocytometer Usage. *Celeromics*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.11.002>

Belkhanchi, H., Rouan, M., Hammi, M., Ziat, Y., & Chigr, M. (2021). Synthesis of biodiesel by transesterification of used frying oils (Ufo) through basic homogeneous catalysts (naoh and koh). *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(5), 12858–12868. <https://doi.org/10.33263/BRIAC115.1285812868>

BioSense. (2017). Evaluating the differences between optical density measurements and the oCelloScope to monitor microbial growth. *BioSense Solutions*, 1–4.

Bligh, E. ., & Dyer, W. . (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.

Boluada, C. J., Macías, M., & González, J. (2019). The chemical complexity of automotive gasolines. *Ciencia, Ingenierías y Aplicaciones*, 2(2), 51–79.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Cabrera, N. A. (2016). *Production and analysis of Biodiesel from the fruits of Roystonea oleracea*. 18.

Caporgno, M. P., Taleb, A., Olkiewicz, M., Font, J., Pruvost, J., Legrand, J., & Bengoa, C. (2015). Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. *ALGAL*, 10, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.011>

Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Biodiesel production from microalgae: Progress and biotechnological prospects. *Hidrobiologica*, 27(3), 337–352. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2017v27n3/Rodriguez>

Chatla, D., Padmavathi, P., & Gatreddi, S. (2020). Wastewater Treatment Techniques for Sustainable Aquaculture. *Springer*. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1620-7>

Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>

Chen, Z., Song, S., Wen, Y., Zou, Y., & Liu, H. (2016). Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris* : a perspective of photosynthesis and oxidant stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 1i. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6997-2>

Cheng, C. H., Du, T. B., Pi, H. C., Jang, S. M., Lin, Y. H., & Lee, H. T. (2011). Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO 2.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Bioresource Technology, 102(21), 10151–10153.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.064>

Chia, M. A., Lombardi, A. T., & Melão, M. da G. G. (2013). Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 85(4), 1427–1438. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201393312>

Chioccioli, M., Hankamer, B., & Ross, I. L. (2014). Flow cytometry pulse width data enables rapid and sensitive estimation of biomass dry weight in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. *PLoS ONE*, 9(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097269>

Cho, D. H., Ramanan, R., Heo, J., Shin, D. S., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016). Influence of limiting factors on biomass and lipid productivities of axenic *Chlorella vulgaris* in photobioreactor under chemostat cultivation. *Bioresource Technology*, 211, 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.109>

Choi, H. J., & Lee, S. M. (2013). Performance of *Chlorella vulgaris* for the removal of ammonia-nitrogen from wastewater. *Environmental Engineering Research*, 18(4), 235–239. <https://doi.org/10.4491/eer.2013.18.4.235>

Davoodbasha, M. A., Pugazhendhi, A., Kim, J. W., Lee, S. Y., & Nooruddin, T. (2021). Biodiesel production through transesterification of *Chlorella vulgaris*: Synthesis and characterization of CaO nanocatalyst. *Fuel*, 300(May 2020), 121018. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121018>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

- de Oliveira, C. Y. B., Abreu, J. L. E., de Oliveira, C. D. L., Lima, P. C., Gálvez, A. O., & de Macedo Dantas, D. M. (2020). Growth of chlorella vulgaris using wastewater from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farming in a low-salinity biofloc system. *Acta Scientiarum - Technology*, 42(1), 1–9. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v42i1.46232>
- Eixler, S., Karsten, U., & Selig, U. (2006). Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia*, 45(1), 53–60. <https://doi.org/10.2216/04-79.1>
- Eladel, H., Abomohra, A. E. F., Battah, M., Mohammed, S., Radwan, A., & Abdelrahim, H. (2019). Evaluation of *Chlorella sorokiniana* isolated from local municipal wastewater for dual application in nutrient removal and biodiesel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(3), 425–433. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2046-5>
- Elichkova, K. V., Irakov, I. S., & Toyanova, S. S. (2014). Biomass Production and Wastewater Treatment From Aquaculture With *Chlorella Vulgaris* Under Different Carbon Sources. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 18(January 2015), 83–88.
- Enwereuzoh, U., Harding, K., & Low, M. (2020). Characterization of biodiesel produced from microalgae grown on fish farm wastewater. *SN Appl. Sci.*, 2, 970.
- Feng, Y., Li, C., & Zhang, D. (2011). Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*, 102(1), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.016>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

- Ferrari, R. A., Da Silva Oliveira, V., & Scabio, A. (2005). Biodiesel from Soybean: Characterization and consumption in an energy generator. *Quimica Nova*, 28(1), 19–23. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000100004>
- Fidalgo, P. (1995). Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. *Growth (Lakeland)*, 1–20.
- Foster, S., & Elzinga, D. (2013). The role of fossil fuels in a sustainable energy system. *UN Chronicle*, 52(3), 17–19. <https://doi.org/10.18356/1007f69a-en>
- Froehner, S., Leithold, J., & Lima Jr., L. F. (2007). Transesterification of vegetable oils: Characterization by thin-layer chromatography and density. *Quimica Nova*, 30(8), 2016–2019.
- Frumento, D., Casazza, A. A., Al Arni, S., & Converti, A. (2013). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in tubular photobioreactors: A lipid source for biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.011>
- Gaspar, R. (2019). Universidad autónoma de baja california. *FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA*.
- Ghosh, S. K. (2020). Waste Management as Economic Industry Towards Circular Economy. In *Emerging Technologies for Waste Valorization and Environmental Protection*. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5736-1_13
- Gómez, L., Tormos, L., & Ortega, Y. (2022). *Cultivo y aplicaciones de Chlorella vulgaris* :

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

principales tendencias y potencialidades en la agricultura Culture and applications of Chlorella vulgaris : main trends and potential on agriculture. 42(1), 70–93.

González, L. C., Trigueros, Á., Hansen, I., & Rodríguez, H. (2014). *Fosfatos en agua de drenaje agrícola: cuenca baja del río sinaloa 1. 1*, 19–28.

Guasumba, L. (2022). Obtención de Lípidos a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual de cerveza artesanal. *Universidad Internacional SEK*.

Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2022). *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890. AlgaeBase. World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway.
<https://www.algaebase.org>

HACH. (2014a). Organic Carbon , Total. *Organic Carbon, Total: Direct Method. DOC316.53.01095. Method 10128, 9*, 1–8.

HACH. (2014b). Phosphorus, Total. *Phosphorus, Total: Phosphorus, Total: Molybdovanadate with Acid Persulfate Digestion Method. DOC316.53.01123. Method 10127, 9*, 1–8.

HACH. (2015). Nitrogen , Total. *Nitrogen, Total: Persulfate Digestion Method. DOC316.53.01085. Method 10072, 11*, 1–8.

Hadrich, B., Akremi, I., Dammak, M., Barkallah, M., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2018). Optimization of lipids' ultrasonic extraction and production from *Chlorella* sp. using response-surface methodology. *Lipids in Health and Disease, 17(1)*, 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12944-018-0702-z>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

- Hee, C. W., Shing, W. L., & Chi, C. K. (2021). Effect of Lead (Pb) exposure towards green microalgae (*Chlorella vulgaris*) on the changes of physicochemical parameters in water. *South African Journal of Chemical Engineering*, 37(April), 252–255. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.04.002>
- Herrera, K. (2021). Obtención de lípidos a partir de biomasa cultivada en agua residual de origen porcino. *Universidad Internacional SEK*.
- Huang, G. H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. W., & Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87(1), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.06.016>
- Illman, A. M., Scragg, A. H., & Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(8), 631–635. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00266-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00266-0)
- INEC. (2016). Estadística de información ambiental económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales 2015 (Agua y Alcantarillado). *Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC, 2015*, 30.
- Kumar, R. R., Rao, P. H., & Arumugam, M. (2015). Lipid extraction methods from microalgae: A comprehensive review. *Frontiers in Energy Research*, 3(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00061>
- Kwon, G., Nam, J. H., Kim, D. M., Song, C., & Jahng, D. (2020). Growth and nutrient removal of *Chlorella vulgaris* in ammonia-reduced raw and anaerobically-digested piggery wastewaters. *Environmental Engineering Research*, 25(2), 135–146.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

<https://doi.org/10.4491/eer.2018.442>

- Lai, J., Yu, Z., Song, X., Cao, X., & Han, X. (2011). Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 405(1–2), 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.05.010>
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2012). Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Applied Energy*, 94, 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.01.075>
- Li, Z., Yu, E., Zhang, K., Gong, W., Xia, Y., Tian, J., Wang, G., & Xie, J. (2020). Water Treatment Effect, Microbial Community Structure, and Metabolic Characteristics in a Field-Scale Aquaculture Wastewater Treatment System. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00930>
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043–1049. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>
- Liu, Y., Lotero, E., & Goodwin, J. G. (2006). Effect of water on sulfuric acid catalyzed esterification. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 245(1–2), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2005.09.049>
- Liu, Z. Y., Wang, G. C., & Zhou, B. C. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99(11), 4717–4722. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.073>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

MAE. (2015). Revision Del Anexo 1 Del Libro Vi Del Texto Unificado De Legislacion Secundaria Del Ministerio Del Ambiente: Norma De Calidad Ambiental Y De Descarga De Efluentes Al Recurso Agua. *Registro Oficial No. 387, 97*, 1–40.

Mathimani, T., Uma, L., & Prabakaran, D. (2015). Homogeneous acid catalysed transesterification of marine microalga *Chlorella* sp. BDUG 91771 lipid - An efficient biodiesel yield and its characterization. *Renewable Energy*, *81*, 523–533. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.03.059>

Micán, M. L. M., & Chaparro, M. Y. S. (2020). Influence of the initial concentration of *Chlorella vulgaris* and CO₂ in the production of lipids. *Revista Lasallista de Investigacion*, *17*(1), 59–69. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n1a5>

Mubashar, M., Naveed, M., Mustafa, A., Ashraf, S., Baig, K. S., Alamri, S., Siddiqui, M. H., Zabochnicka-świątek, M., Szota, M., & Kalaji, H. M. (2020). Experimental investigation of *Chlorella vulgaris* and *Enterobacter* sp. Mn17 for decolorization and removal of heavy metals from textile wastewater. *Water (Switzerland)*, *12*(11). <https://doi.org/10.3390/w12113034>

Nayak, M., Jena, J., Bhakta, S., Rath, S. S., Sarika, C., Rao, B. V. S. K., Pradhan, N., Thirunavoukkarasu, M., Mishra, S. K., Panda, P. K., Prasad, R. B. N., Sukla, L. B., & Mishra, B. K. (2011). Screening of fresh water microalgae from eastern region of India for sustainable biodiesel production. *International Journal of Green Energy*, *8*(6), 669–683. <https://doi.org/10.1080/15435075.2011.588764>

Neczaj, E., & Grosser, A. (2018). *Circular Economy in Wastewater Treatment Plant*–

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Challenges and Barriers. 614. <https://doi.org/10.3390/proceedings2110614>

Nichols, H. W., & Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *Journal of Phycology*, 1(1), 34–38. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x>

Pagels, F., Salvaterra, D., Amaro, H. M., & Guedes, A. C. (2020). Pigments from microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00018-X>

Paniagua, M. J. (2015). Microalgal Nutraceuticals. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00016-9>

Park, J., Kim, B., Chang, Y. K., & Lee, J. W. (2017). Wet in situ transesterification of microalgae using ethyl acetate as a co-solvent and reactant. *Bioresource Technology*, 230, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.027>

Pätsikkä, E., Kairavuo, M., Šeršen, F., Aro, E. M., & Tyystjärvi, E. (2002). Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiology*, 129(3), 1359–1367. <https://doi.org/10.1104/pp.004788>

Peña, S., Mayorga, J., & Montoya, R. (2018). Propuesta de tratamiento de las aguas residuales de la ciudad de Yaguachi (Ecuador). *Ciencia e Ingeniería*, 39(2), 161–168.

Peñarranda, M. T., Martínez-Roldán, A. J., & Villanueva, R. O. (2013). Biodiesel Production

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

from Microalgae: Cultivation Parameters that Affect Lipid Production. *Acta Biologica Colombiana*, 1(2013), 43–68.

Pérez, M., Quishpi, J., Pauta, G., León, F., Cisneros, J., Pinos, V., & Alvarado, A. (2018).

Comparación de las eficiencias de recuperación de lípidos de las microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* obtenidas con diferentes disolventes. *Maskana*, 9(2), 27–34.

<https://doi.org/10.18537/mskn.09.02.04>

Pourjamshidian, R., Abolghasemi, H., Esmaili, M., Amrei, H. D., Parsa, M., & Rezaei, S.

(2019). Carbon dioxide biofixation by *Chlorella* sp. In a bubble column reactor at different flow rates and CO₂ concentrations. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(2), 639–645.

<https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180151>

Pozzobon, V., Cui, N., Moreaud, A., Michiels, E., & Levasseur, W. (2021). Nitrate and nitrite

as mixed source of nitrogen for *Chlorella vulgaris*: Growth, nitrogen uptake and pigment contents. *Bioresource Technology*, 330(February), 124995.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124995>

Prono, L. (2022). *Martinus W. Beijerinck | Microbiólogo y botánico holandés | británica*.

Enciclopedia Británica. <https://www.britannica.com/biography/Martinus-W-Beijerinck>

Ramos, P., Miranda, Y., De Cárdenas, L. M. Z., Ones, O., Milan, A., De Miguel, P., &

Lombardi, A. (2016). Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. *Afinidad*, 73(574), 125–

129.

Ramos, R., & Pizarro, R. (2018). Growth and bioremediation capacity of *Chlorella vulgaris*

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

(Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivated in wastewater generated in the fish farming of the yellowtail amberjack *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53(1), 75–86. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572018000100075>

Rodríguez, J. V. (2008). Análisis de Lípidos de Biomembranas. In *Rosario Argentina* (Issue March). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4691.1529>

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Salazar, L. E. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. *Universidad de Piura*, 145.

Sánchez-Bayo, A., López, D., Morales, V., Espada, J. J., Puyol, D., Martínez, F., Astals, S., Vicente, G., Bautista, L. F., & Rodríguez, R. (2020). Biodiesel and biogas production from *Isochrysis galbana* using dry and wet lipid extraction: A biorefinery approach. *Renewable Energy*, 146, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.148>

Sánchez, A., Vayas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2015). *Pesca Y Acuicultura En Ecuador*. 1–4.

Sánchez, J., & Martínez, Y. (2012). Determinación de Biomasa. *Universidad Nacional de Trujillo*, 1–13.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Sharma, A. K., Sahoo, P. K., Singhal, S., & Joshi, G. (2016). Exploration of upstream and downstream process for microwave assisted sustainable biodiesel production from microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 216, 793–800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.013>

Singh, R., Birru, R., & Sibi, G. (2017). *Nutrient Removal Efficiencies of Chlorella vulgaris from Urban Wastewater for Reduced Eutrophication*. 1–11. <https://doi.org/10.4236/jep.2017.81001>

Soleimani, M., Samipoor, M., & Majidian, N. (2021). Extraction lipids from *Chlorella vulgaris* by supercritical CO₂ for biodiesel production. *South African Journal of Chemical Engineering*, 38(November 2020), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.03.008>

Stein, J. (1973). Culture methods and growth measurements. *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, 448 pp.

Suthar, S., & Verma, R. (2018). Production of *Chlorella vulgaris* under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock. *Process Safety and Environmental Protection*, 113, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.09.018>

Swastika, S., Sushil, K. S., Hare, R. S., Bhaskar, S., & Santosh, K. J. (2022). Bioactive compounds from microalgae. *An Integration of Phycoremediation Processes in Wastewater Treatment*, 337–358. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823499-0.00005-5>

5

Teixeira, D. L., Souza, A., Moura, G. de S., & Leite Júnior, M. C. R. (2021). Reuse of

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

aquaculture wastewater treated in constructed wetlands. *Revista Engenharia Na Agricultura - Reveng*, 29, 347–354. <https://doi.org/10.13083/reveng.v29i1.12465>

Tejido-Nuñez, Y., Aymerich, E., Sancho, L., & Refardt, D. (2019). Treatment of aquaculture effluent with *Chlorella vulgaris* and *Tetrademus obliquus*: The effect of pretreatment on microalgae growth and nutrient removal efficiency. *Ecological Engineering*, 136(June), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.05.021>

Thomas, A. O., Leahy, M. C., Smith, J. W. N., & Spence, M. J. (2017). Natural attenuation of fatty acid methyl esters (FAME) in soil and groundwater. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*, 50(3), 301–317. <https://doi.org/10.1144/qjegh2016-130>

Tom, A., Jayakumar, J. S., Biju, M., Somarajan, J., & Ibrahim, M. A. (2021). Aquaculture wastewater treatment technologies and their sustainability: A review. *Energy Nexus*, 4(July), 100022. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100022>

Toumi, A., Politaeva, N., Đurović, S., Mukhametova, L., & Ilyashenko, S. (2022). Obtaining DHA–EPA Oil Concentrates from the Biomass of Microalga *Chlorella sorokiniana*. *Resources*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/resources11020020>

TULSMA. (2003). Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente. Ministerio del Ambiente del Ecuador. *Registro Oficial Edición Especial 2 de 31-Mar.-2003*, 3399, 1–578.

Usha, S. Z., Rahman, M. R., Sarker, J., & ... (2021). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in aquaculture wastewater as alternative nutrient source and better treatment process. ...

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Journal of Veterinary ..., July, 42–51.

UTEX. (2019). Bold Basal Medium Recipe. *Biosci. Culture Collection of Algae*.

Valchev, G. S., Djondjorov, P. A., Vassilev, V. M., & Dantchev, D. M. (2017). Van der Waals interactions between planar substrate and tubular lipid membranes undergoing pearling instability. *AIP Conference Proceedings*, 1895(October).
<https://doi.org/10.1063/1.5007402>

Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., & Muylaert, K. (2012). Bioresource Technology Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH : Role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology*, 105, 114–119.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.105>

Vega, J. M., Herrera, J., Aparicio, P. J., Paneque, A., & Losada, M. (1971). Role of Molybdenum in Nitrate Reduction by *Chlorella*. *Plant Physiology*, 48(3), 294–299.
<https://doi.org/10.1104/pp.48.3.294>

Vilardell, A. C. (1971). *LIPOBIOQUÍMICA COMPARADA Estudio de lípidos y lipoproteínas en diversas especies animales*.

Vovk, L., Matsiyevska, O., & Zhdanov, O. (2020). *Chlorella vulgaris* in wastewater treatment processes – practical experience. *Theory and Building Practice*, 2020(2), 21–27.
<https://doi.org/10.23939/jtbp2020.02.021>

Vyas, A. P., Verma, J. L., & Subrahmanyam, N. (2010). A review on FAME production processes. *Fuel*, 89(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.08.014>

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

- Wang, J., Zhou, W., Chen, H., Zhan, J., He, C., & Wang, Q. (2019). Ammonium nitrogen tolerant *Chlorella* strain screening and its damaging effects on photosynthesis. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03250>
- Wang, M., Gui, H., Chen, J., Li, C., Wang, C., Chen, C., Zhao, C., & Li, Y. (2022). Experimental Study on Removal of Iron, Manganese and Copper from Water by Microalgae. *Polish Journal of Environmental Studies*, *31*(2), 1847–1855. <https://doi.org/10.15244/pjoes/142483>
- Warwick, C., Guerreiro, A., & Soares, A. (2013). Sensing and analysis of soluble phosphates in environmental samples: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, *41*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.012>
- Wurmann, C. (2019). Acuicultura en América Latina y El Caribe: Progresos, oportunidades y desafíos. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura.*, *1*(1), 1. <https://doi.org/10.33936/at.v1i1.2144>
- Xu, H., Ou, L., Li, Y., Hawkins, T. R., & Wang, M. (2022). Life Cycle Greenhouse Gas Emissions of Biodiesel and Renewable Diesel Production in the United States. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00289>
- You, S. K., Ko, Y. J., Shin, S. K., Hwang, D. hyeuk, Kang, D. H., Park, H. M., & Han, S. O. (2020). Enhanced CO₂ fixation and lipid production of *Chlorella vulgaris* through the carbonic anhydrase complex. *Bioresource Technology*, *318*(August), 124072. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124072>
- Zeng, X., Guo, X., Su, G., Danquah, M. K., Zhang, S., Lu, Y., Sun, Y., & Lin, L. (2015).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1385–1392.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.11.033>

Zheng, H., Gao, Z., Yin, F., Ji, X., & Huang, H. (2012). Lipid production of *Chlorella vulgaris* from lipid-extracted microalgal biomass residues through two-step enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 117, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.007>

Zhu, J., Chen, W., Chen, H., Zhang, X., He, C., Rong, J., & Wang, Q. (2016). Improved productivity of neutral lipids in *Chlorella* sp. A2 by minimal nitrogen supply. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00557>

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

9. ANEXOS

ANEXO 1

Límites máximos permisibles de parámetros fisicoquímicos para la preservación de flora y fauna en agua dulce.

Parámetro	Expresado	Unidad	Límite máximo permisible	Protocolo
Cobre	Cu	mg/L	1	SM 3111-B
Cromo	Cr	mg/L	0.5	SM 3111-B
Hierro	Fe	mg/L	10	SM 3111-B
Oxígeno Disuelto	O. D	mg/L	>60% saturación	SM 4500 O. G
Plomo	Pb	mg/L	0.2	SM 3111-B
Nitrógeno Total	N	mg/L	15	SM 4500 N Kjeldahl
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg/L	250	SM 5220 D
Nitratos	N	mg/L	13	SM 4110-B
Nitritos	N	mg/L	0.2	SM 4110-B
Molibdeno	Mo	mg/L	0.07	SM 3111-B
Níquel	Ni	mg/L	2	SM 3111-B
Sodio	Na	mg/L	200	SM 3111-B
Calcio	Ca	mg/L	30	SM 2340
Fósforo Total	P	mg/L	10	SM 4500-BF
Carbono Orgánico Total	COT	mg/L	No reporta	-

SM: Estándar Method. Protocolos tomados de American Pharmaceutical Association (APHA, 1992). Fuente: (MAE, 2015; TULSMA, 2003)

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

ANEXO 2

Crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* en agua residual acuícola y medio BBM.

Días	Crecimiento Celular					
	Conteo Celular (cel/mL)		Densidad Óptica (680 nm)		Peso Seco (g/L)	
	Agua Acuícola	Medio BBM	Agua Acuícola	Medio BBM	Agua Acuícola	Medio BBM
0	1,34E+06 ± 3,31E+04	1,96E+06 ± 1,10E+04	0,57 ± 0,012	0,38 ± 0,017	0,0050 ± 0,0008	0,0006 ± 0,00E+00
1	1,58E+06 ± 6,63E+04	2,12E+06 ± 1,10E+04	1,17 ± 0,009	0,49 ± 0,198	0,0109 ± 0,0012	0,0014 ± 2,12E+04
2	1,70E+06 ± 3,31E+04	2,41E+06 ± 2,21E+04	1,24 ± 0,006	1,04 ± 0,053	0,0115 ± 0,0017	0,0017 ± 2,12E+04
3	1,68E+06 ± 1,44E+05	3,36E+06 ± 6,63E+04	1,59 ± 0,002	1,07 ± 0,039	0,0119 ± 0,0003	0,0028 ± 1,41E+04
4	1,85E+06 ± 7,73E+04	4,59E+06 ± 3,31E+04	1,70 ± 0,010	1,26 ± 0,025	0,0117 ± 0,0015	0,0033 ± 7,07E+05
5	2,57E+06 ± 5,52E+04	4,74E+06 ± 7,73E+04	1,76 ± 0,028	1,40 ± 0,001	0,0135 ± 0,0003	0,0031 ± 7,07E+05
6	2,84E+06 ± 3,31E+04	4,24E+06 ± 9,94E+04	1,84 ± 0,011	1,48 ± 0,010	0,0182 ± 0,0008	0,0032 ± 0,00E+04
7	3,13E+06 ± 1,10E+05	4,45E+06 ± 1,10E+05	1,92 ± 0,006	1,54 ± 0,004	0,0268 ± 0,0130	0,0039 ± 4,24E+04
8	3,45E+06 ± 9,94E+04	5,04E+06 ± 1,10E+04	1,81 ± 0,004	1,58 ± 0,006	0,0289 ± 0,0186	0,0089 ± 2,83E+04
9	3,55E+06 ± 2,43E+05	5,13E+06 ± 1,44E+05	1,90 ± 0,017	1,69 ± 0,018	0,0306 ± 0,0000	0,0096 ± 2,83E+04
10	3,45E+06 ± 7,73E+04	4,03E+06 ± 6,63E+04	1,71 ± 0,003	1,71 ± 0,013	0,0321 ± 0,0021	0,0099 ± 1,41E+04
11	3,31E+06 ± 1,55E+05	4,80E+06 ± 7,18E+05	1,47 ± 0,026	1,68 ± 0,003	0,0294 ± 0,0037	0,0091 ± 7,07E+04
12	3,19E+06 ± 1,77E+05	3,20E+06 ± 5,52E+04	1,33 ± 0,004	1,67 ± 0,029	0,0298 ± 0,0025	0,0091 ± 9,19E+04

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

ANEXO 3

Crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* en agua residual acuícola y medio BBM.

Días	Concentración de Nitrógeno, Fósforo y Carbono					
	Nitrógeno Total (g/L N)		Fósforo Total (g/L PO ₃ ⁻⁴)		Carbono Total (g/L C)	
	Agua Acuícola	Medio BBM	Agua Acuícola	Medio BBM	Agua Acuícola	Medio BBM
0	168 ± 1,41	34,5 ± 2,83	35,85 ± 0,35	111 ± 2,83	781,5 ± 0,71	258 ± 29,70
1	314 ± 5,66	27 ± 5,66	113,35 ± 2,05	108,05 ± 4,31	792 ± 5,66	136,5 ± 9,19
2	273 ± 2,12	26 ± 1,41	120,75 ± 1,34	105,15 ± 0,21	777 ± 0,00	127,5 ± 1,41
3	211 ± 4,24	22 ± 2,83	93,4 ± 1,70	104,7 ± 1,56	676,5 ± 27,58	122,5 ± 3,54
4	97 ± 0,00	18 ± 4,24	78,6 ± 0,28	104,15 ± 0,92	265,5 ± 2,12	119,5 ± 0,71
5	49,5 ± 2,12	15,5 ± 4,24	29,2 ± 0,00	104,1 ± 1,56	231,5 ± 2,12	115,5 ± 3,54
6	43,5 ± 2,12	13,5 ± 1,41	18,25 ± 0,07	103,5 ± 4,24	86,5 ± 9,19	114,5 ± 0,71
7	43,5 ± 3,54	13,5 ± 0,71	12,25 ± 0,35	102,5 ± 0,00	84,5 ± 2,12	110,5 ± 0,71
8	24 ± 0,00	11,5 ± 1,70	10,25 ± 0,07	99,5 ± 4,24	77,5 ± 3,54	108,5 ± 4,95
9	23,5 ± 2,12	11 ± 0,14	9,35 ± 0,07	99,35 ± 1,63	65 ± 2,83	105,5 ± 0,71
10	28 ± 0,00	10,5 ± 2,26	9,65 ± 0,78	97,25 ± 2,19	63 ± 4,24	101 ± 0,00
11	23,5 ± 2,12	10,5 ± 1,41	9,7 ± 0,28	96,05 ± 3,04	58 ± 2,83	100,5 ± 6,36
12	11 ± 1,41	10 ± 1,41	9,5 ± 0,42	95,7 ± 0,99	52 ± 0,00	97,5 ± 2,83

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE
Chlorella vulgaris CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

ANEXO 4

Crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* en agua residual acuícola y medio BBM.

Proceso	Biomasa	Catalizador	Etanol	Metanol	AE	CM	MCH	Hexano	
FAME Indirecto	Biomasa Seca	H ₂ SO ₄	19,05 ± 0,004	17,35 ± 0,011	48,65 ± 0,027	69,15 ± 0,047	34,90 ± 0,021	61,35 ± 0,041	
		Resina	0,90 ± 0,001	1,40 ± 0,002	2,80 ± 0,002	8,70 ± 0,006	2,35 ± 0,000	6,00 ± 0,0035	
	Biomasa Húmeda	H ₂ SO ₄	21,35 ± 0,013	19,8 ± 0,012	52,65 ± 0,031	63,50 ± 0,042	39,45 ± 0,016	58,25 ± 0,029	
		Resina	3,80 ± 0,008	2,55 ± 0,002	16,75 ± 0,011	15,40 ± 0,0013	3,85 ± 0,001	8,15 ± 0,0037	
	FAME AGL	Biomasa Seca	H ₂ SO ₄	47,85 ± 0,027	42,65 ± 0,023	80,8 ± 0,046	88,90 ± 0,049	50,95 ± 0,029	82,55 ± 0,047
			Resina	5,00 ± 0,002	7,05 ± 0,001	11,55 ± 0,004	13,00 ± 0,0071	3,85 ± 0,001	9,35 ± 0,0027
FAME Directo	Biomasa Seca	H ₂ SO ₄	70,33 ± 0,03						
		Resina	14,62 ± 0,001						

Valores presentados en porcentaje (% m/m)