

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. 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  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA”**

Realizado por:

**THAÍS CAMILE FLOR MEJÍA**

Director del proyecto:

**PhD (c) Johanna Medrano Barboza**

Como requisito para la obtención del título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

10 de Marzo de 2023

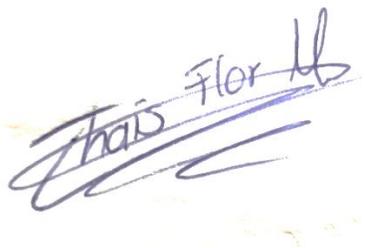
**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

**DECLARATORIA JURAMENTADA**

Yo, THAÍS CAMILE FLOR MEJÍA, con cédula de identidad # 1725992984, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o 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.

A handwritten signature in blue ink, reading "Thaís Flor Mejía", with a large, stylized flourish underneath.

**FIRMA**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

**DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA”**

Realizado por:

**THAÍS CAMILE FLOR MEJÍA**

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

  
**FIRMA**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. 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 trabajado presentado,  
lo han calificado como apto para su defensa oral ante  
el tribunal examinador



**FIRMA**



**FIRMA**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. 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  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Paúl Flor y Gina Mejía que han hecho todo lo posible para darme una carrera universitaria y en el camino nunca me han dejado sola, por no dejar pasar un día sin sentir su apoyo y amor.

A mi hermano Paúl Flor por su paciencia, confianza y cariño.

A mi tía Adriana Mejía por brindarme su ayuda e impulsarme a salir de mi zona de confort.

A mis amigos y compañeros de tesis Alisson Vega, Samuel Arroyo, Israel Del Valle por ayudarme a no desmayar y saber que siempre estarán ahí.

A mis amigos Fabiana Chicaiza, Alex Armendáriz y Jorge Moreno, por sus consejos y su apoyo incondicional.

A mi perro Osito por todas las desveladas en las que me pudo acompañar en la redacción de esta tesis y que lamentablemente ya no está.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la profesora Johanna Medrano por su apoyo y su manera tan bonita de enseñar nunca me he sentido sola en este proceso. A los profesores Susana Chamorro y Alberto Aguirre por siempre tener abiertas las puertas a cualquier duda y por su paciencia.

A la Universidad por haberme dado 5 años de enseñanzas para formarme como una gran profesional y por las amistades que he formado a lo largo del camino.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

**Para someter a:**

**To be submitted:**

**Thaís Camile Flor Mejía<sup>1</sup>, Johanna Medrano Barboza<sup>1\*</sup>, Alberto Alejandro  
Aguirre Bravo<sup>1</sup>, Susana Elizabeth Chamorro Arias<sup>1</sup>**

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN  
ACUÍCOLA”**

<sup>1</sup>Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

fecha

\*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 *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

## **RESUMEN**

La contaminación producida por los combustibles fósiles y el aumento de demanda de energía, requieren de una solución limpia y sostenible como los biocombustibles. El biocombustible obtenido a partir de microalgas presenta ventajas al adaptarse a diversos medios de cultivos reduciendo costes totales de producción al usar aguas residuales con alto contenido de N y P. Tal es el caso de las aguas residuales de origen acuícola; la especie *Scenedesmus* sp. identificado por primera vez por Meyen en 1829, es capaz de utilizar los nutrientes presentes en el agua residual para generar biomasa y al mismo tiempo remediar el agua. En este trabajo se determinó el crecimiento de la microalga en agua residual de origen acuícola, donde se obtuvieron valores de productividad específica de  $0.077\text{ d}^{-1}$ , tasa de crecimiento específica de  $0.296\text{ d}^{-1}$  y biomasa total de  $0.577\text{ g/L}$ . Así mismo se calculó los porcentajes de remoción de nitrógeno total de 97.62%, fósforo total de 97.88% y carbono orgánico total de 94.91%. Se calculó el rendimiento de lípidos a partir de seis solventes: metilciclohexano, acetato de etilo, etanol, cloroformo-metanol (1:2), hexano y metanol, donde el porcentaje más alto se obtuvo con el solvente cloroformo-metanol (1:2) de 32.16%. El porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) también fue calculado y su porcentaje más alto fue de 42% con la ayuda de hexano; sin embargo, no logró alcanzar el porcentaje de AGL requerido de 80%. La producción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME – por sus siglas en inglés) fue más exitosa a partir de los lípidos de AGL extraídos con la mezcla cloroformo:metanol (1:2) con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como catalizador donde el porcentaje fue de 74.90%. Para concluir se realizó una cromatografía de capa fina para cualificar las muestras obtenidas donde se pudo observar la presencia de triglicéridos en las muestras de FAME y AGL con la mezcla cloroformo:metanol (1:2).

**Palabras claves:** *Scenedesmus* sp., agua residual acuícola, remoción de nutrientes, lípidos.

# **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

## **ABSTRACT**

The pollution produced by fossil fuels and the increase in energy demand require a clean and sustainable solution such as biofuels. The biofuel obtained from microalgae presents advantages by adapting to diverse cultivation environments, reducing total production costs by using wastewater with high N and P content. Such is the case of aquaculture wastewater; the species *Scenedesmus* sp. can use the nutrients present in the wastewater to generate biomass and at the same time remediate the water. In this work, the growth of the microalgae in aquaculture wastewater was determined, where specific productivity values of  $0.077 \text{ d}^{-1}$ , specific growth rate of  $0.296 \text{ d}^{-1}$  and total biomass of  $0.577 \text{ g/L}$  were obtained. The percentages of total nitrogen removal of 97.62%, total phosphorus of 97.88% and total organic carbon of 94.91% were also calculated. The lipid yield was calculated from six solvents: methylcyclohexane, ethyl acetate, ethanol, chloroform:methanol (1:2), hexane and methanol, where the highest percentage was obtained with the solvent chloroform-methanol (1:2) of 32.16%. The percentage of free fatty acids (FFA) was also calculated and its highest percentage was 42% with the help of hexane; however, it failed to reach the required FFA percentage of 80%. The production of fatty acid methyl esters (FAME) was more successful from the FFA lipids extracted with the chloroform methanol mixture (1:2) with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  as catalyst where the percentage was 74.90%. To conclude, thin layer chromatography was performed to qualify the samples obtained, where the presence of triglycerides was observed in the FAME and FFA samples with the chloroform:methanol (1:2) mixture.

**Key words:** *Scenedesmus* sp., aquaculture wastewater, nutrient removal, lipids.

# **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

## **1. INTRODUCCIÓN**

De acuerdo a Dhanya (2020), debido al crecimiento de la población, la energía es cada vez más demandada, lo cual se refleja en un mayor uso de recursos energéticos no renovables. El alto consumo de combustible provoca problemas ambientales globales como el calentamiento global y la contaminación del aire. Para lograr satisfacer las necesidades energéticas, el mundo ha recurrido al petróleo, el gas natural y el carbón, donde el petróleo tuvo una participación del 30.95%, el carbón el 26.90% y el gas natural el 24.42%. Solo en el año 2021, los combustibles fósiles representaron el 80% del consumo de energía primaria. (Karakurt, 2023).

Debido a que el consumo de combustibles fósiles es una fuente importante de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), los biocombustibles son una alternativa prometedora como fuente de energía limpia para satisfacer las necesidades en los sectores del transporte, generación de energía y calefacción (Abdullah, 2019). Los biocombustibles son una rama de las energías renovables que se producen a partir de la fermentación de fuentes biológicas que contienen azúcar, lípidos o carbohidratos fermentables como aceites vegetales y grasas animales (Mat, 2020).

Los biocombustibles se clasifican en diferentes grupos los cuales son catalogados según las materias primas y el método de producción utilizado. Estos grupos son denominados biocombustibles de primera, segunda, tercera y cuarta generación (Alalwan, 2019). Los de primera generación se extraen a partir de materias primas comestibles, en esta categoría se encuentran el trigo, arroz, papas, caña de azúcar, cebada y aceite vegetal. Los de segunda generación se obtienen a partir de residuos forestales y biomasa leñosa. Al necesitar de áreas de cultivo, fertilizantes y suministros de agua esta generación no es tan

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

viable, además la biomasa de segunda generación requiere de procesos de pretratamiento para recuperar el azúcar fermentable. Debido a las limitaciones de la primera y segunda generación, se exploró una fuente diferente de materia prima para biocombustibles (Mat, 2020).

El desarrollo de la tercera generación está en auge con la producción de biomasa microalgal, varias investigaciones como Debnath (2021) y Mojifur (2019), han demostrado que esta opción podría ser meritorio como una fuente de energía sostenible para la posterior producción de biocombustibles, ya que su fabricación lograría superar varias debilidades de las fuentes de biocombustibles previamente analizadas (Chowdhury, 2019).

Los biocombustibles de cuarta generación se obtienen de biomasa de microorganismos genéticamente modificadas para incrementar la producción de biocombustibles. Las modificaciones genéticas más utilizadas suelen ser para aumentar la penetración de la luz, mejorar la eficiencia fotosintética y reducir la fotoinhibición (Abdullah et al., 2019).

Existen algunas ventajas respecto al uso de biocombustibles derivados de microalgas, por ejemplo, tienen un crecimiento rápido y varias especies; incluida *Scenedesmus* sp., tienen un contenido de aceite en el rango de 20 a 50% del peso seco de la biomasa (Subía, 2018). Son capaces de producir aceite todo el año, no requieren de extensiones de tierra para sus cultivos, de igual manera las microalgas reducen la carga sobre las fuentes de agua dulce al necesitar menos agua en comparación con los cultivos terrestres, algunas especies pueden cultivarse en aguas salobres minimizando los impactos ambientales (Tripathi et al., 2019).

Las microalgas son microorganismos autótrofos que sintetizan compuestos orgánicos a partir de la energía de la luz solar y CO<sub>2</sub> de la atmósfera. Sin embargo, algunas pueden tener un metabolismo heterótrofo utilizando moléculas orgánicas complejas como fuente de

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

energía (Valdés, 2021). Así mismo, participan en diferentes ciclos biogeoquímicos globales, produciendo oxígeno atmosférico y regulando el clima (Morillas, 2021)

Su desarrollo simple permite que se adapten a condiciones medio ambientales y prosperen a largo plazo. Las más importantes son: algas verdes conocida como *Chlorophyta*, algas rojas; *Rhodophyta*, y diatomeas; *Bacillario-phyta* (Valdés, 2021)

*Scenedesmus* sp. pertenece a la división *Chlorophyta*, de la clase *Chlorophyceae* y orden *Sphaeropleales* (Ramos, 2014). Este género suele encontrarse tanto de forma individual como en colonias, acostumbran a estar agrupadas por su lado longitudinal, de 2 a 32 células, aunque normalmente éstas son de 4-8 células. Las células suelen presentar un tamaño de 3-78 x 2-10  $\mu\text{m}$ , presentan formas esféricas, así como elipsoidales alargadas o fusiformes (Ramos, 2014). Se encontró que *Scenedesmus* sp. es la especie de microalga más adecuada para la biomitigación de  $\text{CO}_2$  por su alta producción de biomasa ( $0.218 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), y capacidad de fijación de carbono (Camacho et al., 2019).

La escala de producción de biomasa algal requiere de algunas entradas como medio acuoso y nutrientes lo que puede significar una alta inversión y para que su producción sea factible, se necesita una técnica viable, socialmente aceptable y sostenible (Tripathi et al., 2019). Para reducir el uso de fertilizantes y costes totales de producción, se puede utilizar aguas residuales con un alto contenido en nitrógeno y fósforo como medio de cultivo; así mismo, varios estudios han demostrado la eficacia de las microalgas para la remoción de nitrógeno y fósforo de diferentes fuentes de aguas residuales (Pham, 2020).

Las primeras investigaciones sobre el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales se dieron en el año de 1950 donde se presencié la remoción de nutrientes como nitrógeno y fósforo de las aguas residuales domésticas sedimentadas de manera eficiente en un sistema simbiótico (Mobin, 2014).

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

La acuicultura desempeña un rol muy importante en la producción mundial de comida; tan solo en el año 2007, la acuicultura presentó cerca del 44% de la producción total de pescado (Sonnino, 2013). Este sector puede prevenir la escasez de especies en el mercado, así como el incremento drástico de precios. Frecuentemente las especies en acuicultura son producidas para exportación, y existen muchos países donde representa a una importante industria; por ejemplo, la exportación del camarón en Tailandia y Ecuador (Boyd, 2012). En Ecuador, la piscicultura también presenta grandes oportunidades de exportación respecto al cultivo de tilapias especialmente, en el año 2019 se registró un ingreso de más de 8 millones de dólares en exportación de pescado congelado (Mamallacta, 2021).

También es importante recalcar que la abundante cantidad de aguas residuales generadas por las industrias acuícolas son una preocupación debido a su alta concentración de materiales orgánicos, nutrientes y organismos por lo que su remediación es importante (Kurniawan et al., 2021). La investigación de Omotade y colaboradores (2019) sobre el análisis de características de las aguas residuales de la acuicultura y agua subterránea, informó que los contenidos de nutrientes de N y P eran de hasta 8.5 y 2.5 mg/L respectivamente y la demanda química de oxígeno igual a 108.7 mg/L.

La especie *Scenedesmus* sp. por sus habilidades fotosintéticas, utiliza los nutrientes presentes en el agua residual para generar biomasa y un alto contenido de lípidos de entre 15 y 300 veces mayor a los cultivos convencionales que puede ser útil en la producción de productos de valor agregado como el biodiesel (Tripathi et al., 2019).

Respecto a la calidad de los lípidos, es deseable un alto contenido de lípidos de almacenamiento o triacilglicerol (TAG) para obtener una mayor conversión de lípidos a FAME (Mathimani et al., 2021). Los lípidos de microalgas habitualmente se extraen de la biomasa antes de ser convertidos en biodiesel mediante métodos mecánicos como

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

homogeneizadores celulares, ultrasonidos, autoclave, o por métodos no mecánicos como congelación, utilización de solventes orgánicos, ácido y base, etc (Rawat et al., 2013).

Los lípidos se pueden transformar en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME por sus siglas en inglés) mediante procesos de transesterificación. Los FAME que contienen ácidos grasos C16/C18 como el ácido palmítico y el ácido esteárico respectivamente, son los más adecuados para la producción de biodiesel de alta calidad (Tripathi et al., 2019). La transesterificación mediada por catálisis ácida, básica o enzimática, es una reacción química para disminuir la viscosidad en los bioaceites, convirtiéndolos en biodiesel. Esta reacción es necesaria ya que, el aceite de microalgas tiene una alta viscosidad por lo que requiere la conversión a constituyentes de menor peso molecular (Rawat et al., 2013).

Con el fin de conocer si la especie *Scenedesmus* sp. podría ser capaz de una futura producción de biodiesel se planteó determinar el rendimiento de lípidos a partir de biomasa microalgal de *Scenedesmus* sp. cultivadas en agua residual de origen acuícola. Para ello se caracterizó el agua residual mediante análisis fisicoquímicos para la determinación de su uso potencial como medio de cultivo de microalgas, posterior a esto, se realizó el análisis del crecimiento microalgal en un fotobiorreactor para la producción de biomasa con fines de extracción de lípidos conjuntamente a la caracterización del agua residual mediante análisis fisicoquímicos para la determinación de su uso potencial como medio de cultivo de microalgas y la determinación de la fracción lipídica de la biomasa cultivada mediante procesos de extracción de lípidos totales, ácidos grasos libres y ésteres metílicos, demostrando si se cumple o no la hipótesis que establece que; el agua residual de origen acuícola posee un contenido de nutrientes adecuado para el crecimiento de *Scenedesmus* sp. en 13 días de cultivo, generando un porcentaje de lípidos superior al 20% y de ácidos grasos libres superior al 80%, extraídos con solventes orgánicos como acetato de etilo y la mezcla

# **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

cloroformo: metanol (1:2), obteniendo ésteres metílicos de ácidos grasos superiores al 90%, con potencial uso en la producción de biodiesel.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Área de Estudio**

El área de estudio comprende al Distrito Metropolitano de Quito. La recolección del agua residual de origen acuícola se efectuó en una piscícola ubicada en Nanegalito en el mes de diciembre, en las estribaciones de la cordillera occidental cuya altitud varia de los 1400 a los 2800 msnm y temperatura de 15° a 22° C.

### **2.1 Metodología**

#### **2.1.1 Fase de Campo**

- **Obtención de medio de cultivo**

La muestra de agua residual de origen acuícola fue recolectada dos veces en los meses de diciembre de 2021 y marzo 2022 en una piscícola de Nanegalito que forma parte de la subregión territorial del noroccidente de Pichincha. Se recogieron 60 L de agua en 3 canecas de 20 L cada una, intentando remover los nutrientes del fondo de la piscina con la ayuda de una varilla. En la piscina donde se recolectó el agua se mantenían peces que estaban por desovar. Las canecas se etiquetaron y almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso. Los análisis y parámetros fisicoquímicos del agua se muestran en la Tabla 1.

- **Obtención del inóculo**

La cepa de *Scenedesmus* sp. utilizada en este estudio, fue obtenida del Banco Español de Algas y se conservó en medio líquido Bold's Basal Medium (BBM) en una relación 1:10. Se mantuvo con luz artificial en fotoperiodos de 12 horas, aireación constante a 4.2 l/min y se realizaron cambios de medio cada 15 días.

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

### 2.1.2 Fase de Laboratorio

- **Caracterización del medio de cultivo**

Se recogieron 500 mL del agua residual de origen acuícola en una botella previamente esterilizada. Se analizó la concentración de macronutrientes (nitrógeno total, fósforo total, carbono orgánico total) con la ayuda de protocolos HATCH análogos al método 1072 (HACH 2014a), 10127 (HACH 2014c) y 10128 (HACH 2014b), respectivamente.

- **Preparación de medio de cultivo**

Se recolectaron 60 L de agua residual de un piscícola ubicada en Nanegalito, de los cuales 50 L de agua fueron esterilizados con la ayuda de un recipiente pyrex de 5 galones en autoclave a 121°C y 15 psi por 30 minutos siguiendo el protocolo de Qin et al., (2014). Posteriormente, se removieron las partículas sólidas con la ayuda de un filtro cilíndrico multicapas de agua de forma análoga a las investigaciones de Wang et al., (2015).

- **Preparación del inóculo**

Se inocularon 720 mL de medio BBM junto con 80 mL de la cepa de *Scenedesmus* sp. en 7 botellas de vidrio de 1 L, las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente, con luz artificial en fotoperiodos de 12 horas y una entrada de aire constante junto con un filtro de salida de aire durante 7 días hasta alcanzar una concentración de  $10^6$  cel/mL.

- **Siembra del inóculo en fotobiorreactor**

Se inoculó el cultivo de microalgas con una proporción 1:10 en un fotobiorreactor (71.3 cm de largo \* 8.8 cm de ancho \* 61 cm de alto) que contenía 45 l de agua residual previamente tratada y filtrada, y 5 litros de cultivo de *Scenedesmus* sp. en medio BBM. El fotobiorreactor se mantuvo en condiciones atmosféricas de Quito desde el 22 de marzo hasta el 04 de abril de 2022 con aireación continua de 4.2 L/min, la cual permitió un flujo de

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

burbujas removiendo las microalgas por todo el fotobiorreactor evitando su sedimentación; el control de temperatura se realizó con la ayuda de una termocupla ( $27 \pm 3^\circ\text{C}$ ) durante 13 días. El pH se monitoreó diariamente verificando que se encontrara cerca de un pH neutro.

### **• Determinación de crecimiento de microalgas**

Se recolectó 50 mL de muestra diariamente del fotobiorreactor durante 13 días en botellas de plástico previamente desinfectadas por luz UV y etiquetadas. Se colocaron en refrigeración a  $4^\circ\text{C}$  anterior a su estudio. El crecimiento de los cultivos se realizó por triplicado y se determinó mediante espectrofotometría, conteo celular y peso seco.

- La densidad óptica se midió por espectrofotometría, la cual se realizó a una longitud de onda de 680 nm con un espectrofotómetro marca HACH 5000 siguiendo el protocolo de (Arias, 2013). Agitando las botellas con las muestras de los respectivos días, se colocó 1 ml de muestra con la ayuda de una micropipeta en una celda dentro del espectrofotómetro lo que permitió conocer la absorbancia.
- El conteo celular se realizó mediante el recuento de las células visualizadas en la cámara de Neubauer en un microscopio óptico marca Leica con el lente 40X y se determinó mediante la Ecuación (1).

(1)

$$\text{Concentración celular } \left(\frac{\text{cel}}{\text{ml}}\right) = \frac{\# \text{células } \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) * 10.000}{\# \text{ de cuadros} * \text{dilución}}$$

- El peso seco se realizó mediante la utilización de filtros de papel para análisis cualitativos con secado a  $60^\circ\text{C}$  durante 24 h análogamente a la investigación de (Chia et al., 2013). Para ello, se etiquetaron los filtros de papel colocados en vidrio relojes y se secaron durante 24 horas a  $60^\circ\text{C}$ , posteriormente se pesaron y se colocó 1 mL de muestra en el papel (las botellas fueron agitadas previo a la obtención de la

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

muestra) y se situaron una vez más en la estufa a 60°C durante 24 horas. Se pesó el filtro con la muestra y mediante la Ecuación (2) se logró obtener el peso final.

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

La productividad volumétrica (PV) se calculó con la ayuda de la Ecuación 3 utilizada por Encalada (2022) donde relaciona la biomasa seca con el volumen de cultivo por el tiempo del mismo. Adicionalmente se calculó la productividad específica de la biomasa con la Ecuación 4, el tiempo de duplicación de las microalgas con la Ecuación 5, y la tasa de crecimiento específica con la Ecuación 6 donde  $N_T$  representa el número de células al final de la fase exponencial,  $N_0$  es el número de células al comienzo de la fase exponencial,  $T_T$  es el día final de la fase exponencial, y  $T_0$  es el día de inicio de la misma fase. Los valores de pH y temperatura fueron determinados por un pH-metro de marca Thermo Scientific.

$$PV \text{ de biomasa} = \frac{\text{peso de biomasa seca} (g)}{\text{volumen de cultivo} (L) * \text{tiempo de cultivo} (d)} \left( \frac{g}{Ld} \right) \quad (3)$$

$$PE \text{ de biomasa} = \frac{PV \text{ de biomasa} \left( \frac{g}{Ld} \right)}{\text{Concentración de biomasa} \left( \frac{g}{L} \right)} (d^{-1}) \quad (4)$$

$$\text{Tiempo de duplicación} (t_D) = \frac{\text{Ln} (2)}{\mu} (\text{días}) \quad (5)$$

$$\text{Tasa de crecimiento específica} (\mu) = \frac{\text{Ln} (N_T/N_0)}{T_T - T_0} (d^{-1}) \quad (6)$$

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

- **Parámetros fisicoquímicos**

Las muestras recogidas diariamente fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se recolectó para el posterior análisis por triplicado de los parámetros fisicoquímicos del cultivo. Se utilizaron protocolos HACH para la determinación de los macronutrientes como Nitrógeno Total (NT), Fósforo Total (PT) y Carbono Orgánico Total (PT). El porcentaje de remoción de nutrientes fue calculado en base a la Ecuación 7 utilizada por Eladel (2019) la cual determinó el grado de eliminación de los respectivos nutrientes. Esta ecuación relaciona la concentración inicial del nutriente ( $C_I$ ) y la concentración final ( $C_F$ ) entre la concentración inicial ( $C_I$ ) por 100%.

(7)

$$\%Remoción\ de\ Nutrientes = \frac{(C_I - C_F)}{(C_I)} * 100\%$$

Así mismo, se analizaron otros parámetros fisicoquímicos y metales pesados previo al cultivo y posterior a los 13 días de cultivo con el sobrenadante, y se determinó la remoción de dichos metales.

- **Cosecha y obtención de biomasa microalgal:**

Una vez culminados los 13 días de producción de biomasa, el contenido del fotobiorreactor se trasladó al laboratorio de Química y Procesos en la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas para centrifugar a 4500 rpm por 5 min en falcons de 50 mL, se recolectaron seis litros del sobrenadante para análisis posteriores, y el sobrenadante restante se desechó. El proceso de centrifugado se realizó por triplicado para remover el mayor contenido de agua. La biomasa húmeda se llevó a refrigeración de -4 °C similar a la metodología de Huamán, (2011). La obtención de biomasa seca se realizó con la ayuda de

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

una estufa de convección forzada durante 24 h a 100 °C. La biomasa húmeda y seca se guardó para análisis posteriores.

- **Extracción de lípidos**

La extracción de lípidos totales presentes en la biomasa húmeda y seca, se extrajeron de solventes orgánicos, entre ellos: hexano, metanol, cloroformo:metanol (1:2), etanol, acetato de Etilo, metilciclohexano. Se determinaron análogamente al método de Bligh & Dyer modificado por IMARPE (Salazar Pérez, 2012). Se adicionó un lavado con NaCl al 0.58% y se homogeneizó mediante centrifugaciones a 4000rpm. Para lograr la disrupción celular, además del método químico se utilizó un sonicador. La expresión los resultados se determina mediante la Ecuación (8) donde  $P_L$  se refiere al peso del frasco con el contenido lipídico ya extraído y seco, y  $P_B$  al peso de la biomasa microalgal donde el porcentaje total será representado en % m/m.

(8)

$$\%Lípidos = \left( \frac{P_L}{P_B} \right) * 100\%$$

La Ecuación 9 se utilizó para calcular la productividad total volumétrica de lípidos, utilizada por Guasumba (2022) y Vega (2022); donde  $M_L$  representa la masa de lípidos, el volumen del cultivo (V) y el tiempo en días (t). Mediante la Ecuación 10 se calculó la productividad específica de biomasa en base a la productividad volumétrica de biomasa por la concentración de biomasa.

(9)

$$Productividad\ Total\ Volumétrica \left( \frac{g}{l * d} \right) = \left( \frac{M_L}{V * t} \right)$$

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

(10)

$$\text{Productividad Específica de Biomasa} = \frac{\text{Prod. Vol Biomasa} \left( \frac{g}{l * d} \right)}{\text{Conc, Biomasa} \left( \frac{g}{l} \right)}$$

- **Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL):**

La extracción de Ácidos Grasos Libres totales (AGL) presentes en la biomasa seca, consistió en la saponificación de biomasa con los solventes orgánicos mencionados anteriormente. Se determinaron mediante el protocolo de extracción de AGL de (Tanzi et al., 2013). La ecuación (11) se utilizó para calcular el porcentaje de Ácidos grasos libres (AGL) que se midió por gravimetría donde ( $T_1$ ) hace referencia al peso del frasco vacío, ( $T_2$ ) al peso de frasco con la muestra de AGL multiplicado por el peso de la masa inicial utilizada para realizar la extracción (W).

(11)

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

- **Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME):**

La extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos presentes en la biomasa seca y las grasas obtenidas anteriormente (lípidos y AGL), se determinaron en tres procesos (directo, indirecto y de ácidos grasos libres) con un catalizador ácido homogéneo ( $H_2SO_4$ ) y un catalizador ácido heterogéneo (Resina comercial CT-269DR); con el siguiente procedimiento:

Se colocó dentro de cada reactor de vidrio una relación de (catalizador:solvente:biomasa o grasa), para el catalizador homogéneo es (1.74:15:1) y para el catalizador heterogéneo es (1.1:70:1). Se colocaron los reactores en baño térmico a 90 °C por 4 horas a 900 rpm. Al finalizar, la fase orgánica se filtró en el equipo Millipore y se

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

agregó 2 ml al filtrado de una mezcla hexano:dietiléter (80:20) para eliminar impurezas. Luego se pasó a un embudo de decantación, se agitó y dejó reposar por 10 min para alcanzar la separación de fases. Finalmente se trasvaso la fase orgánica a un tubo Falcon previamente pesado y se dejó secar 60 °C por 24 h y peso el recipiente con el producto seco (Narváez et al. 2004). Se calculó el rendimiento a biodiesel en la Ecuación (12).

(12)

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

- **Cromatografía por capa fina (TLC)**

Para la cromatografía en capa fina se utilizó la técnica manejada por Vega (2022); en una placa de gel sílice de 40 x 80 mm de 0.2 mm de sílica gel se dibujaron varias líneas; la primera a 1 cm de la base que se denomina línea de origen y se colocaron 3 puntos donde se ubicarán el control (oleato de colesterol marca SIGMA) resuspendido con 20 µl de cloroformo, una muestra de AGL y una de FAME. La segunda línea se trazó a 5 cm de la primera, posteriormente se colocó la placa sobre un papel absorbente y se secó por 30 minutos a 100 °C para activarla. Pasados los 30 minutos se colocaron las muestras disueltas en 3 µl se su propio solvente extractor y con un tubo capilar de 1.4 mm de diámetro se colocaron las muestras en la placa. En un frasco se colocaron 50 mL de la fase móvil en este caso cloroformo puro, y se ubicó la placa verticalmente de manera que el cloroformo no pase de la primera línea durante 10 minutos análogamente al protocolo de Cabrera (2016). A continuación, se retiró la placa de la fase móvil, y se colocó en un nuevo frasco que contenía yodo y sílice, se dejó reposar por 10 minutos más para su revelado. La cromatografía se realizó con el mejor solvente extractor de AGL y FAME. El factor de retención ( $R_f$ ) se determinó mediante la Ecuación (13) utilizada por Rodríguez (2008).

# OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

(13)

$$R_f = \left( \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra (Y)}}{\text{Distancia recorrida por la muestra (X)}} \right)$$

## 2.1.3 Análisis estadísticos de los datos.

Los datos obtenidos de todos los análisis (concentración celular, peso seco, densidad óptica, pH, remoción de nutrientes, porcentaje de lípidos, AGL y FAME se realizaron por triplicado y con la ayuda de la prueba Krustal & Wallis con el programa Statgraphics, se hizo pruebas con las comparaciones de sus medias y se expresaron con valores de desviación estándar ( $X \pm DE$ ). Existe una diferencia entre medias significativo cuando ( $p < 0.05$ ).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Caracterización del medio de cultivo

En la tabla 1 se puede apreciar los valores obtenidos respecto a los macronutrientes presentes en el agua residual de origen acuícola y en el medio BBM. Se observa que el carbono orgánico total es el único nutriente con mayor concentración en el agua acuícola.

Tabla 1. Caracterización del agua de origen acuícola y medio BBM mediante análisis fisicoquímicos.

	AGUA ACUÍCOLA	MEDIO BBM
CARBONO ORGÁNICO TOTAL (mg/L)	794	4
NITRÓGENO TOTAL (mg/L)	166.5	262
FÓSFORO TOTAL (mg/L)	85.1	127.8

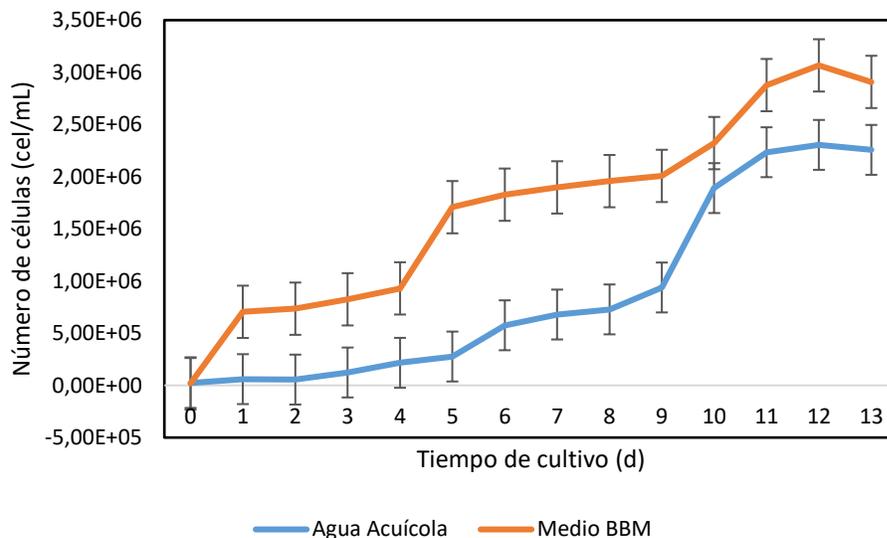
## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

### **3.2 Determinación del crecimiento celular**

#### 3.2.1 Densidad celular

En la Figura 1 se observa el crecimiento de densidad celular de la microalga *Scenedesmus* sp. en agua de origen acuícola (línea azul), y en medio de control Bold's Basal Medium - BBM (línea naranja) cultivadas por 13 días. Respecto al agua de origen acuícola como medio de cultivo, se observa que en el día cero el cultivo presenta una concentración de  $2.32 * 10^4 \pm 3.2 * 10^3$  cel/mL. Desde el día 0 al día 4 es lo que se denomina como fase de adaptación; a continuación, se aprecia la fase exponencial del día 4 al 11 logrando su estado estacionario con una concentración de  $2.23 * 10^6 \pm 1.77 * 10^5$  cel/mL desde el día 11 al 12. El día 12 presentó la mayor concentración con un valor de  $2.30 * 10^6 \pm 1.44 * 10^3$  cel/mL; así mismo, se observa que desde el día 13 comienza el periodo de muerte celular. En cuanto a la curva del cultivo en medio BBM, esta demuestra su fase exponencial desde el día 9 llegando a su máxima concentración en el día 11 con  $2.88 * 10^6 \pm 1.66 * 10^4$  cel/mL iniciando con la muerte celular desde el día 12 llegando al día 13 con una concentración celular igual a  $2.91 * 10^6 \pm 1.22 * 10^4$  cel/mL. Mediante la representación gráfica de los datos, se demuestra que el medio BBM presenta una mayor concentración de células en comparación al medio de agua de origen acuícola.

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA



**Figura 1.** Densidad celular (cel/mL) vs tiempo de cultivo (d) de *Scenedesmus* sp. cultivada por 13 días en agua residual de origen acuícola con su respectivo cultivo en BBM. Los datos finales se presentan como el promedio de triplicados y su respectiva desviación estándar.

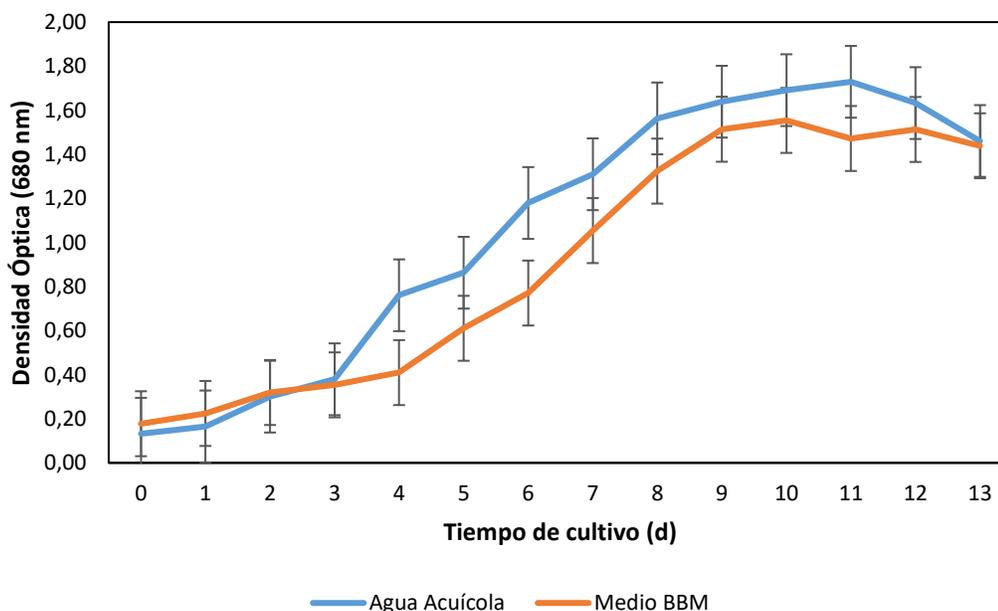
### 3.2.2 Densidad óptica

En la Figura 2 se aprecia la densidad óptica calculada en una longitud de onda de 680 nm, obtenida posterior a los 13 días de cultivo en agua de origen acuícola (línea azul) y con su respectivo control cultivado en medio BBM (línea naranja). En el cultivo en agua de origen acuícola, se muestra un crecimiento exponencial desde el día 2 al día 8 donde la densidad pasa de  $0.301 \pm 1.15 \times 10^{-3}$  a  $1.563 \pm 3.75 \times 10^{-2}$ , respectivamente. En el día 8 se aprecia el comienzo de la fase estacionaria y su densidad se mantiene constante entre  $1.563 \pm 0.166$  hasta el día 11 donde se observa la mayor densidad de  $1.729 \pm 2.00 \times 10^{-3}$ . La fase de muerte celular se aprecia desde el día 12 terminando el registro del día 13 con una densidad igual a  $1.563 \pm 2.08 \times 10^{-2}$ .

Respecto al control, se observa que su densidad en el día cero igual a  $0.178 \pm 2.08 \times 10^{-3}$  es muy similar al de agua de origen acuícola cuyo valor inicial fue de  $0.132$

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

$\pm 4.04 * 10^{-3}$ . La curva del control muestra un crecimiento exponencial hasta el día 9 donde su densidad de a  $1.514 \pm 4.00 * 10^{-3}$ . El día en el que alcanza la mayor densidad igual a  $1.554 \pm 2.00 * 10^{-3}$  es el día 10. Los datos muestran que la densidad óptica fue ligeramente mejor en el cultivo de agua acuícola.

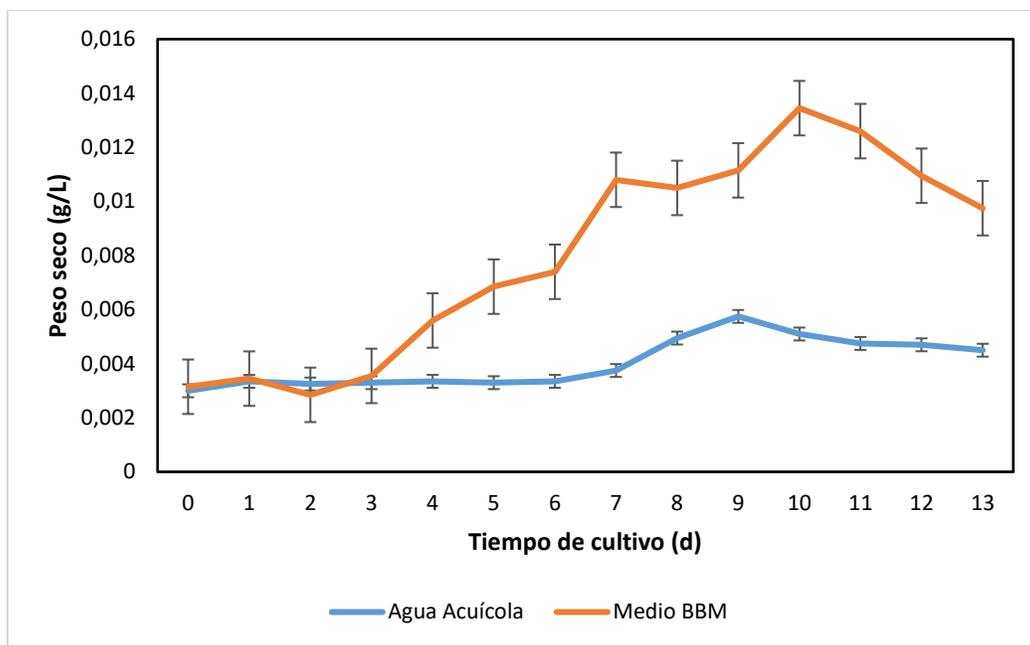


**Figura 2.** Densidad óptica en (nm) vs tiempo de cultivo (d) de *Scenedesmus* sp. cultivada por 13 días en agua residual de origen acuícola con su respectivo control en medio BBM. Los datos finales se presentan como el promedio de triplicados y su respectiva desviación estándar.

### 3.2.3 Peso seco

La Figura 3 muestra el peso seco en g/mL obtenidos posterior a los 13 días de cultivo. El día 0 muestra un peso seco igual a  $0.003 \pm 0.0034$  g/mL, se observa un crecimiento paulatino y el día con mayor registrado fue el 9 con un peso seco de  $0.00575 \pm 0.0006$  g/mL. Finalmente, la muerte celular se observa desde el día 10 hasta llegar al día 13 donde el peso da un total de  $0.0045 \pm 0.0018$  g/mL.

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA



**Figura 3.** Peso seco (g/mL) vs tiempo de cultivo (d) de la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual de origen acuícola por 13 días con su respectivo control en medio BBM. Los datos finales se presentan como el promedio de triplicados y su respectiva desviación estándar.

Respecto a la curva del control en medio BBM, se observa al día 0 con una concentración igual a  $0.00315 \pm 0.00007$  g/mL que es una concentración muy similar a la que se presentó en el medio de cultivo acuícola en el mismo día. Se visualiza la fase de adaptación hasta el día 3, y el comienzo de la fase exponencial del día 4 al día 10 donde la concentración aumentó de  $0.0055 \pm 0.0038$  a  $0.01345 \pm 0.00007$  g/mL respectivamente. A continuación, se aprecia la fase de muerte celular desde el día 11 hasta terminar en el día 13 con una concentración igual a  $0.00975 \pm 0.0002$  g/mL. Por ende, la Figura 3 demostró que, el cultivo en BBM presentó mayor peso seco en comparación al medio acuícola.

En la Tabla 2 se observan los datos obtenidos en la productividad volumétrica y específica, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de *Scenedesmus* sp. cultivada en medio acuícola, y su control en medio BBM. Los resultados de la tabla indicaron un mejor

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

rendimiento en el medio BBM en comparación con el medio de origen acuícola en cuanto a biomasa total donde se presentó una producción de biomasa 1.12 veces mejor, así como en productividad volumétrica donde fue superior el control por 1.12 veces. Sin embargo, en el medio acuícola la tasa de crecimiento específica fue 1.95 veces lo cual comprobó que el agua es óptima para el crecimiento microalgal. Así mismo, se observó un mejor tiempo de duplicación. Los datos de productividad específica se mantuvieron iguales para ambos medios.

**Tabla 2.** Generación de biomasa, productividad volumétrica y específica, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de *Scenedesmus* sp. en agua residual de origen acuícola y su respectivo control en medio BBM.

Medio de Cultivo	Agua Residual Acuícola	Control BBM
Biomasa Total (g/L)	0.497	0.557
Productividad Volumétrica (g/L*d)	0.038	0.043
Productividad Específica (d <sup>-1</sup> )	0.077	0.077
Tasa de crecimiento específica (μ)	0.296	0.149
Tiempo de Duplicación (t <sub>D</sub> )	2.344	4.646

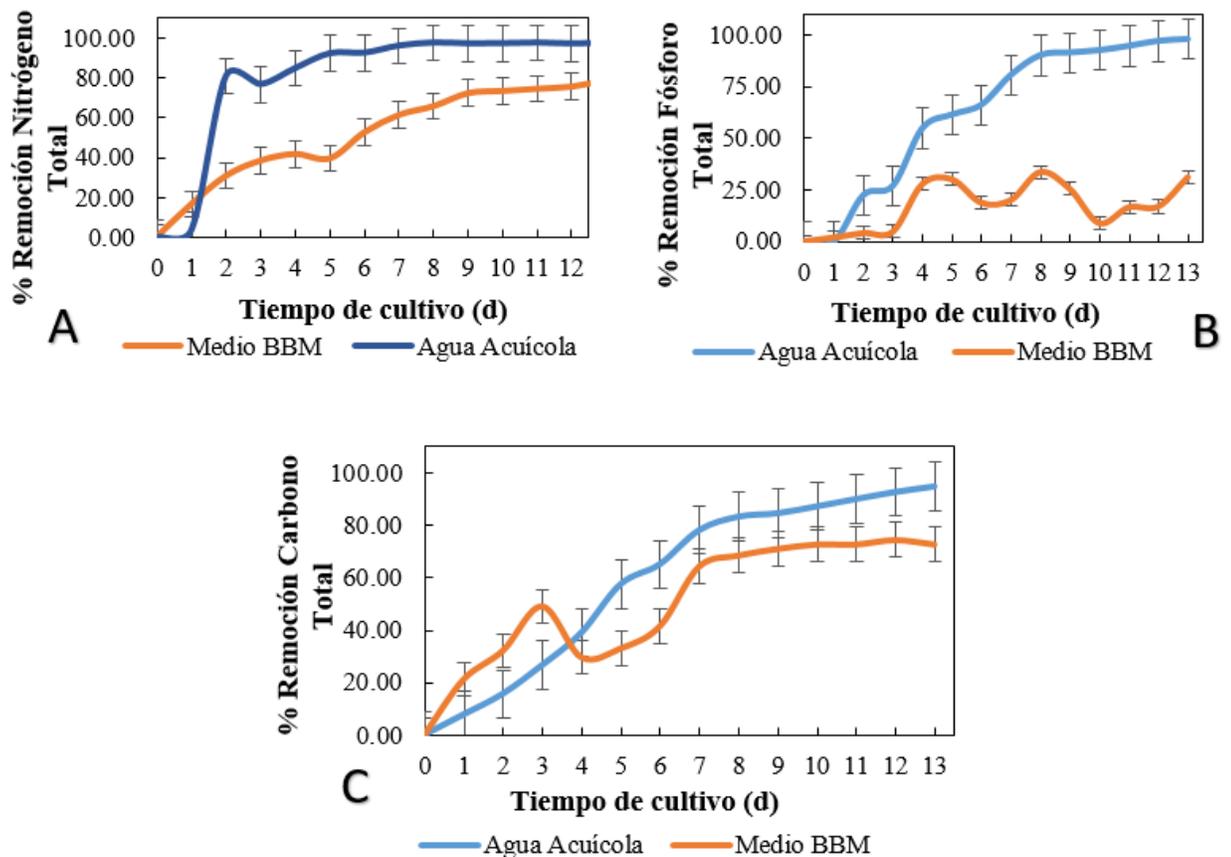
50 L para el cultivo en agua acuícola. 40 L para el control en medio BBM.

### 3.3 Remoción de nutrientes y análisis de parámetros fisicoquímicos

En la Figura 4 se observan los parámetros fisicoquímicos (NT, PT, COT) del agua residual de origen acuícola durante 13 días de cultivo con su respectivo control en BBM. La Figura 4A, muestra la cantidad de Nitrógeno Total (NT) removido del agua. Respecto al agua de origen acuícola, se presenta una pequeña fase de adaptación en el día 0 con una

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

concentración de  $168 \pm 1.41$  mg/L y el día 1 con una concentración igual a  $162 \pm 4.24$  mg/L. A continuación, se observa una fase exponencial desde el día 2; con una remoción de nitrógeno igual a 80.95% y una concentración igual a  $32 \pm 00$  mg/L. Llega al día 13 con una concentración de  $4 \pm 4.24$  mg/L y un porcentaje de remoción igual a 97.62%. Su control en BBM presenta una curva ascendente que comienza en el día 0 donde hubo una concentración de  $45.5 \pm 2.12$  mg/L. Llega a su fase estacionaria en el día 9 hasta el día 13 con concentraciones de  $12.5 \pm 0.71$  y  $9.5 \pm 0.71$  mg /L, respectivamente con una remoción final de 79.12%, concluyendo que, la remoción en medio acuícola fue mejor.



**Figura 4** Remoción nutrientes (mg/L) vs tiempo de cultivo (d) de la especie *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual de origen acuícola por 13 días. A) Nitrógeno total, B) Fósforo total y C) Carbono orgánico total.

En la Figura 4B en el cultivo de agua de origen acuícola muestra una curva ascendente respecto a la remoción de Fósforo Total (PT), llega a la fase estacionaria en el día 8 con una

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

concentración de  $7.45 \pm 0.21$  mg/L hasta el día 13 con una concentración igual a  $1.6 \pm 0.42$  mg/L y un porcentaje de remoción de 97.88%. El control en medio BBM muestra una curva multimodal en donde se observa que el día con mayor porcentaje de remoción fue el día 8 con 33.65% con una concentración igual a  $77 \pm 6.65$  mg/L llegando al día final de cultivo con una concentración de  $79.9 \pm 7.78$  mg/L y un porcentaje de remoción de 31.15%, lo que demostró una remoción mejor en el medio acuícola. En la Figura 4C se muestra la remoción de Carbono Orgánico Total (COT). La remoción en el medio de agua de origen acuícola muestra una curva ascendente, el día cero cuenta con una concentración de  $726.5 \pm 12.02$  mg/L, y se observa un incremento destacable de remoción desde el día 7 cuya concentración de COT es de  $158.5 \pm 24.75$  mg/L con un porcentaje de remoción de 78.18% y llega al día 13 con concentración de 37 mg/L con una remoción final de 94.91%. En el control en medio BBM se observó una concentración de  $59 \pm 1.41$  mg/L en el día 0 llegando al día 13 con una concentración final de  $16 \pm 1.41$  mg/L y un porcentaje de remoción de 72.88%, demostrando una vez más que la especie *Scenedesmus* sp. presentó una mejor remoción de nutrientes en el agua de origen acuícola.

La Tabla 3 muestra la concentración en el día 0 (concentración inicial) y en el día 13 (concentración final) de los nutrientes (NT, PT y COT), y el porcentaje de remoción de los mismos en el agua de origen acuícola.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

**Tabla 3.** Concentración inicial, final y porcentaje de remoción de Nitrógeno Total, Fósforo Total y Carbono Total del cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua de origen residual de origen acuícola por 13 días.

<b>Parámetros Físicoquímicos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>% Remoción final</b>
Nitrógeno total (mg/L N)	168 ± 1.41	4 ± 4.24	97.62
Fósforo total (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	75.5 ± 0.71	1.6 ± 0.42	97.88
Carbono total (mg/L C)	726.5 ± 12.02	37 ± 0.00	94.91

Como se mencionó en la metodología, el agua residual de origen acuícola fue analizada en términos de metales y turbidez previo a la inoculación y luego de la cosecha del cultivo. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3, en la que se observan los valores de concentración inicial y final con su respectivo porcentaje de remoción de metales pesados y otros metales que son requeridos en trazas para el crecimiento de la microalga. Se aprecia que los porcentajes de remoción son bastante altos lo que sugiere que, posterior a los 13 días de cultivo de *Scenedesmus* sp. en el agua de origen acuícola, existió una alta remoción de los metales analizados. Se observa en la Tabla 4 una remoción de calcio y hierro del 18.75% y 3192%, respectivamente. Los metales como el níquel, plomo, molibdeno y cromo tuvieron concentraciones fuera del rango, por lo que no se logró medir el porcentaje de remoción. El cobre, nitrógeno amoniacal, potasio, y sodio presentaron un incremento de concentración.

**Tabla 4.** Remoción de nutrientes en agua residual de origen acuícola por *Scenedesmus* sp. Los valores se expresan como resultado del promedio de triplicados con su respectiva

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

desviación estándar.

<b>Parámetros Físicoquímicos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Remoción Total (%)</b>
Calcio (mg/L)	13.44 ± 0.06	10.92 ± 0.05	18.75
Cobre (mg/L)	< 0.01	0.020 ± 0.002	-
Cromo (mg/L)	< 0.01 LD	< 0.01	*
Hierro (mg/L)	0.73 ± 0.04	0.31 ± 0.02	57.53
Molibdeno (mg/L)	< 0.04	0.050 ± 0.003	*
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	8.30 ± 0.5	10.95 ± 0.66	-
Níquel (mg/L)	< 0.05	<0.05	*
Plomo (mg/L)	< 0.05 LD	<0.05 LD	*
Potasio (mg/L)	6.18 ± 0.42	61.95 ± 3.84	-
Sodio (mg/L)	5.05 ± 0.41	37.40 ± 3.03	-
Turbidez (NTU)	5.6	9.3	-

\*Valores fuera de rango. –Sin remoción. LD. Límite de Detección.

### 3.4 Determinación de lípidos

#### 3.4.1 Extracción de Lípidos Totales

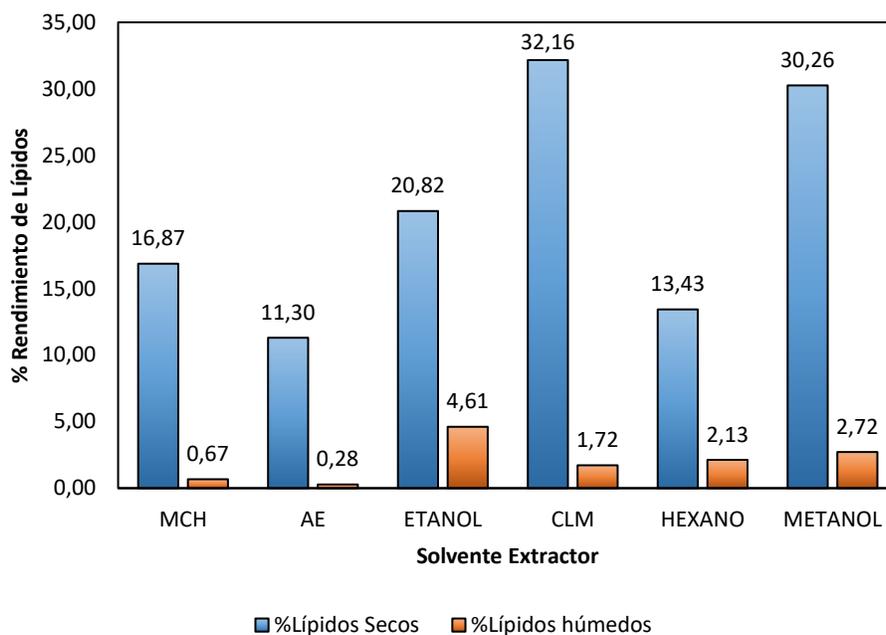
En la Figura 5 se observa el porcentaje de lípidos extraídos a partir de la biomasa seca y

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

biomasa húmeda posterior a los 13 días de cultivo con la ayuda de seis solventes; metilciclohexano, acetato de etilo, etanol, cloroformo:metanol (1:2), hexano y metanol. La productividad total de lípidos tuvo un resultado de 0.0093 g/L\*d y la productividad específica fue igual a 0.076 d<sup>-1</sup>. Se muestra en la imagen que el mejor solvente en extracción de lípidos por biomasa seca fue cloroformo:metanol (1:2) con un porcentaje de lípidos de 32.16% y una productividad lipídica de 0.299 g/L\*d, siendo el metanol el segundo mejor solvente con un porcentaje de lípidos de 30.26% con una productividad de 0.281 g/L\*d, seguido de etanol con 20.82% y productividad lipídica de 0.193 g/L\*d, metilciclohexano con un porcentaje igual a 16.87% y 0.157 (g/L\*d) de productividad lipídica, hexano y acetato de etilo tuvieron los menores valores de porcentaje y productividad lipídica. Los valores obtenidos de la biomasa húmeda fueron menores al 5% de lípidos, el mejor solvente fue etanol donde su producción de lípidos fue igual a 4.61% y productividad de 0.057 g/L\*d, metanol demostró ser el segundo mejor con una obtención de lípidos de 2.71% y productividad de 0.034 g/L\*d, el siguiente fue hexano (2.13% y 0.026 (g/L\*d)), después se ubicó el cloroformo,

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA

metilciclohexano y el acetato de etilo siendo los solventes con menor rendimiento de lípidos.

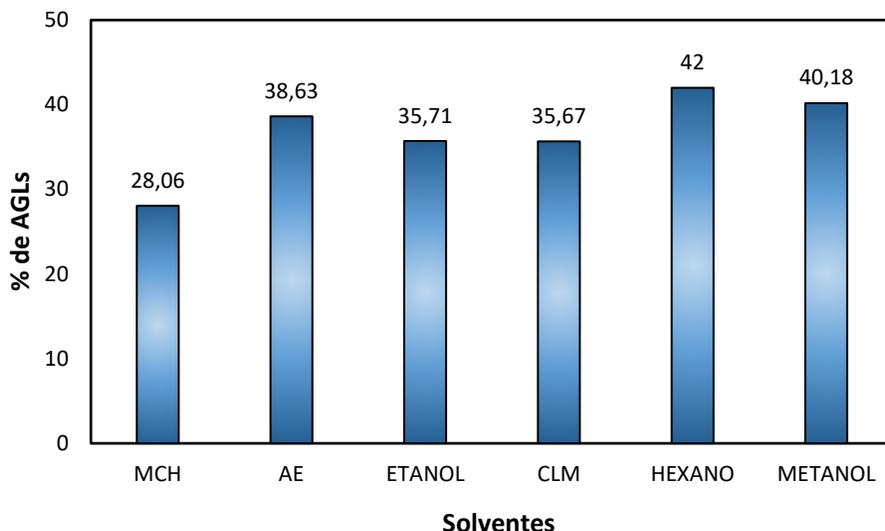


**Figura 5.** Determinación de grasas lipídicas en *Scenedesmus* sp. a partir de biomasa húmeda y biomasa seca con ayuda de los solventes extractores metilciclohexano (MCH), acetato de etilo (AE), etanol, cloroformo:metanol (1:2) (CLM), hexano y metanol.

### 3.4.2 Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL)

En la Figura 6 se aprecian los porcentajes de extracción de ácidos grasos libres (AGL) utilizando los solventes metilciclohexano (MCH), acetato de etilo (AE), etanol, cloroformo:metanol (1:2) (CLM), hexano y metanol. Hexano fue el solvente con mayor porcentaje de AGL igual a 42% seguido del metanol con un porcentaje bastante similar, siendo este de 40.18%, el acetato de etilo tuvo un rendimiento de 38.63%, el etanol tuvo un porcentaje de 35.71%, a continuación, fue el cloroformo:metanol (1:2) de 35.67%, siendo el último metilciclohexano con un porcentaje de 28.06%.

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA



**Figura 6.** Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL) con los solventes extractores; metilciclohexano (MCH), acetato de etilo (AE), etanol, cloroformo-metanol (1:2) (CLM), hexano y metanol. A partir de biomasa seca recolectada posterior al cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua de origen acuícola por 13 días.

### 3.4.3 Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME)

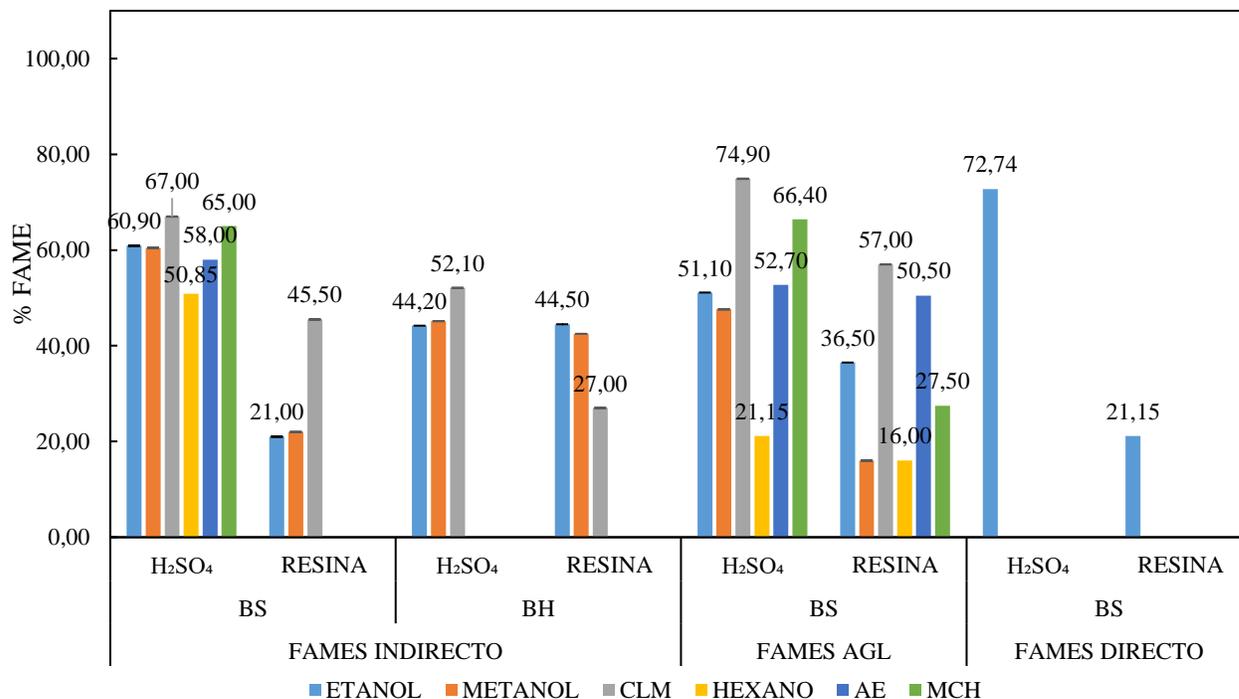
En la Figura 7 se muestra los porcentajes de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos posterior a los 13 días del cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua de origen acuícola. Se utilizaron dos tipos de catalizadores; ácido sulfúrico 96% ( $H_2SO_4$ ) como catalizador ácido homogéneo y la resina comercial CT-269DR como catalizador ácido heterogéneo, así como los lípidos extraídos con los 6 solventes extractores previamente mencionados para la extracción indirecta y los AGL obtenidos con los mismos solventes, mientras que la extracción directa se realizó a partir de la biomasa seca. Respecto a la extracción indirecta con los lípidos de biomasa seca y con ácido sulfúrico el mejor solvente fue cloroformo-metanol (1:2) con un porcentaje de 67%, el siguiente fue metilciclohexano con 65%, el etanol tuvo un porcentaje de FAME de 60.90% seguido de metanol con 60.45%, acetato de etilo con 58% y por último hexano con 50.85%. Los datos con resina como catalizador se presentan con los mejores tres solventes que fueron cloroformo:metanol (1:2) con 45.50%,

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

metanol con 22% y por último etanol con un rendimiento de 21%. Para los FAME extraído con lípidos de biomasa húmedos se utilizaron los mismos tres solventes cloroformo:metanol (1:2), metanol y etanol con resultados de 52.10%, 45.15% y 44.20%, respectivamente.

Los FAME de AGL de biomasa seca presentaron mejores resultados con ácido sulfúrico con porcentajes de 74.90% de cloroformo:metanol (1:2), 66.40% con metilciclohexano, etanol con 51.10% y por último hexano con 21.15%. Con catalizador de resina comercial, el mejor solvente fue cloroformo-metanol (1:2) con 57% seguido de acetato de etilo con 50.50%, etanol con 36.5% y por último metanol y hexano con 16%.

FAME directo con biomasa seca arrojó mejores resultados con catalizador de ácido sulfúrico con un porcentaje de 72.74% en comparación con la resina que obtuvo un porcentaje de 21.15%.



**Figura 7.** Extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) directo (biomasa seca), indirecto (lípidos) y de AGL, con diferentes catalizadores; ácido sulfúrico y resina. La

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

extracción indirecta y de AGL se realizó con la ayuda de los solventes extractores; metilciclohexano (MCH), acetato de etilo (AE), etanol, cloroformo:metanol (1:2) (CLM), hexano y metanol.

Los mejores resultados se obtuvieron a partir de FAME de AGL donde el cloroformo:metanol (1:2) presentó el mejor rendimiento (74.90%), y en FAMES directo se obtuvo el segundo mejor rendimiento con ácido sulfúrico como catalizador (72.74%). El rendimiento con catalizador ácido presentó mejores resultados en comparación al catalizador básico. El valor de  $p < 0.05$  demostró que no existen valores significativos en los FAME obtenidos con ácido sulfúrico.

### **3.5 Cromatografía de capa fina**

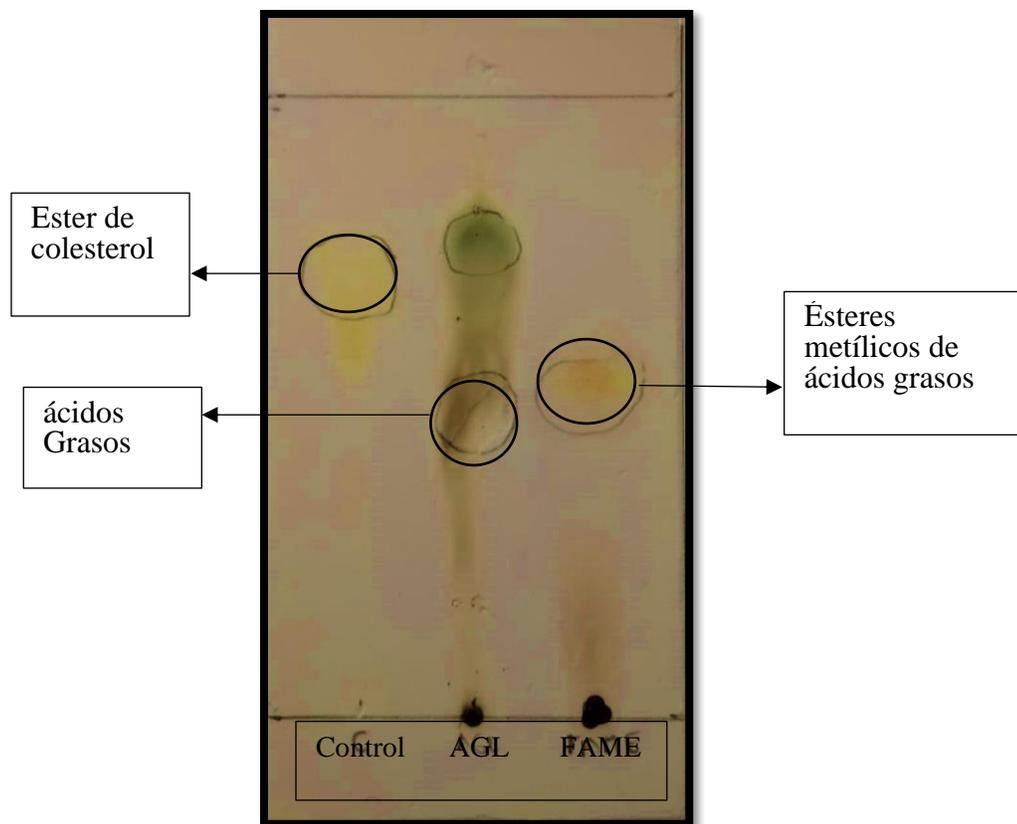
Para la verificación cualitativa de la existencia de ésteres metílicos de ácidos grasos, se realizó una cromatografía en capa fina de los AGL y FAME obtenidos con los mejores solventes. En la Figura 8 se puede observar la cromatografía obtenida con el mejor solvente de AGL y FAME; cloroformo:metanol (1:2). Para el control se usó una muestra de oleato de colesterol. Las distintas distancias que han corrido las muestras en su fase móvil y sus respectivos valores de retención se encuentran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Cálculo de factor de retención de AGL y FAME obtenidas mediante cromatografía de capa fina de *Scenedesmus* sp. en agua de origen acuícola

<b>Muestra</b>	<b>X (cm)</b>	<b>Y (cm)</b>	<b>R<sub>f</sub></b>
Control	6	4.6	0.77
AGL	6	3.2	0.53
FAME	6	3.8	0.63

R<sub>f</sub>: Factor de retención. X: distancia Y distancia recorrida

## OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA



**Figura 8.** Cromatografía de capa fina de ácidos grasos libres (AGL) y ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) obtenidos a partir de *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual acuícola.

### 4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La caracterización del agua residual de origen acuícola se pudo observar en la Tabla 1. Respecto a las concentraciones obtenidas podemos asegurar que el agua acuícola cuenta con los nutrientes necesarios para ser utilizada como medio de cultivo microalgal. Sharma (2020), indica que existen algunos parámetros para optimizar el crecimiento de las microalgas como nutrientes (nitratos, fosfatos, fuentes de carbono, etc.), luz, temperatura, concentración de CO<sub>2</sub>.

Los resultados del crecimiento celular de *Scenedesmus* sp. se aprecian en la Figura 1, 2 y 3 en términos de densidad celular, densidad óptica y peso seco. En la Figura 1 se observan

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

los resultados obtenidos de densidad celular donde, la especie *Scenedesmus* sp. tuvo un mejor crecimiento en el medio BBM en comparación al medio de agua acuícola. El estudio de Sharma (2018) afirma que el medio BBM tiene una composición óptima para el crecimiento de microalgas y es uno de los medios más utilizados para el cultivo de las mismas. Así mismo, la investigación de Quispe (2018), demuestra que el medio BBM es óptimo para el crecimiento de la especie *Scenedesmus* sp. ya que la densidad celular supera los  $5 * 10^6$  cel/mL en 7 días de cultivo.

No obstante, el valor obtenido en el cultivo de agua residual presenta valores ligeramente inferiores, lo que indica que a pesar que el BBM haya tenido un mejor crecimiento, el agua de origen acuícola es también eficaz para el crecimiento microalgal. Kurniazan et al (2021) establece que esto se debe a que, el agua residual producida por la industria acuícola, es caracterizada por su alta demanda química de oxígeno biológico (DBO), demanda química de oxígeno (DQO), proteínas, nitrógeno, y Sharma (2018) afirma que el carbono, fósforo y nitrógeno son los nutrientes vitales necesarios para mantener el crecimiento de las microalgas. Así lo confirma también el estudio de Andrade et al., (2009) para la producción de biomasa microalgal de *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería en el año 2009 donde el cultivo a cielo abierto llegó a un estado estacionario con una densidad celular de  $8.05 \pm 0.55 * 10^6$  cel/mL concluyendo que esta agua puede ser usado como fuente para la producción de biomasa y reduciendo costos de producción asociados al uso de agua fresca en grandes volúmenes.

Los resultados de la densidad óptica se aprecian en la Figura 2 donde se observa una densidad óptica mayor en la curva de la *Scenedesmus* sp. cultivada en agua de origen acuícola al comparar los días con mayor densidad donde en el cultivo de agua acuícola fue el día 11. El estudio de Vega (2022) establece que, estos resultados pueden deberse a la turbidez

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

presente el agua acuícola, impidiendo el paso de luz y mostrando una densidad óptica mayor. En este caso el agua residual presentó un aumento de la turbidez descrita en la Tabla 4, por lo que se puede ver reflejado en los datos obtenidos en la absorbancia en la Figura 2. Kurniawan (2021), comenta que la turbidez es causada por la existencia de sólidos en suspensión en el agua procedentes de balanceados de peces. Muchas industrias incluyendo la acuicultura liberan efluentes altamente turbios con un alto contenido de sólidos y aguas ricos en nutrientes (Kurniawan et al., 2021). Por lo tanto, el resultado es análogo al estudio de Vega (2022) cuyo valor de la turbidez también se vio afectada directamente por la absorción de luz de la muestra en el espectrofotómetro.

En el estudio de Jiménez (2008) titulado “Remoción de nutrientes inorgánicos con microalgas coinmovilizadas en quitosano” se realizó la medición de la densidad óptica de *Scenedesmus* sp. Donde la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 550 nm diariamente durante 10 días y dio como resultado máximo 0.061, densidad menor a la presentada en esta investigación debido a que utilizaron el medio “F” descrito por Guillard y Ryther el cual es conocido como un medio universal para la estimulación del crecimiento de microalgas (Villareal, 2020).

La Figura 3 muestra los resultados obtenidos a partir del peso seco de *Scenedesmus* sp. cultivada en agua de origen acuícola y su control en BBM. En esta figura se logra apreciar que el peso seco fue más alto en el cultivo que usó al medio BBM en comparación con el cultivo de agua residual de origen acuícola. La producción de biomasa celular de la misma especie en la investigación de Quevedo (2008), tuvo una producción mucho mayor a la descrita en nuestros medios, llegando así al día 12 con una concentración de biomasa de 0.08 g/L. Cabe recalcar que, en ese estudio la microalga *Scenedesmus* sp. fue cultivada en medio algal el cual fue modificado para tener una mayor fuente de carbono, nitrógeno y fósforo, y

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

tuvo un crecimiento hasta el día 32, lo que significa que este medio nunca tuvo deficiencia de nutrientes. Respecto a los pesos secos presentados por días en el cultivo de agua de origen acuícola, hacen falta investigaciones.

En la Tabla 2 se muestran los valores obtenidos respecto a la generación de biomasa, cuyos valores son próximos a los reportados en el estudio de Charity (2009) la producción de biomasa microalgal a cielo abierto utilizando aguas residuales de pescadería para el cultivo de *Scenedesmus* sp. Y obteniendo una biomasa total de 0.44 g/L, demostrando la gran habilidad de adaptación que tiene esta especie al medio de cultivo y a las condiciones externas (Andrade, 2009).

La Tabla 2 también muestra la productividad volumétrica en medio acuícola los cuales son próximos a los del estudio de Guerrero (2014) en el cual se presenta una productividad volumétrica de 0.026 g/L\*d para *Scenedesmus* sp. cultivada en 9 L de efluente de tilapia, y 0.054 g/L\*d cultivada en 9 L de medio BBM, también menciona que el valor en BBM es mayor debido al alto contenido de nitrógeno y fósforo que existe en este medio (Guerrero et al., 2014). Esto también explica porque en la presente investigación los datos registrados en medio BBM son más altos que los del agua residual de origen acuícola. Respecto de la productividad específica, los resultados presentan valores similares a los obtenidos por Nayak (2011) y sus colaboradores donde realizan un cultivo de *Scenedesmus* sp. en medio BBM con productividad específica de 0.073 d<sup>-1</sup>.

La tasa de crecimiento específica depende de la fase exponencial del cultivo por lo tanto puede variar de acuerdo al comportamiento de la microalga en el medio y su fase exponencial. En el estudio de Guerrero (2014) denominado “Cultivo en batch de *Scenedesmus* sp. utilizando efluentes de tilapia del Nilo”, el resultado de tasa de crecimiento específica fue igual a 0.010 d<sup>-1</sup> en 9 días de cultivo utilizando como medio el efluente de

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

tilapia, y  $0.008 d^{-1}$  en 9 días de cultivo en control BBM (Guerrero, 2014), valores menores a los encontrados en el presente estudio.

Ligado al crecimiento celular de la microalga, existe una remoción de nutrientes en el medio, lo cual puede ser aprovechado en las industrias acuícolas para la biorremediación de las mismas (Kurniawan et al., 2021). Esto se puede observar en la Figura 4 y Tabla 3 donde se logra apreciar el porcentaje de remoción de nitrógeno total, fósforo total y carbono orgánico total, así como de otros metales analizados en esta investigación.

El porcentaje de remoción de nitrógeno total en medio acuícola es mayor al valor reportado en el estudio de Pham et al., (2019), el cual presentó un porcentaje de remoción de 83.6% usando como medio de cultivo muestras de planta de aguas residuales de fertilizantes en Vietnam con una concentración inicial de microalgas de 60 mg/L. El nitrógeno es un elemento importante en el metabolismo de las especies de microalgas y su asimilación está conectada directamente a la fotosíntesis (Khatoon et al., 2016). Este elemento modula la síntesis de proteínas y, por tanto, el metabolismo de crecimiento de las algas. Las algas pueden usar nitrógeno en varias formas como nitratos, nitritos, urea y amoníaco como se encuentran presentes en el agua residual en su forma inorgánica (Sharma et al., 2018; Khatoon et al., 2016). La eliminación de nitrógeno de los cultivos de algas se ve afectada por dos factores, la utilización directa de N por las algas y la 'extracción  $NH_3$ '. Este último proceso supone la eliminación de N en forma de amoníaco con el aire empleado para la aireación del medio (Tam, 1989).

La remoción del fósforo total (Figura 4B) presentó un porcentaje alto en el cultivo con agua de origen acuícola. En la investigación de Andrade (2009), el porcentaje de remoción de fósforo en el cultivo de agua residual de piscadería fue de 77.54% menor al registrado en la presente investigación. Andrade y sus colaboradores aseguran que la

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

remoción del nutriente no se relaciona con la densidad celular, y explica que probablemente no se dio una remoción más alta debido a que durante el tiempo de cultivo (22 días) se dio la fase de muerte celular donde las células muertas liberaron fósforo total nuevamente al agua.

El carbono también es un elemento fundamental del sistema vivo, y constituye el 50% de la biomasa microalgal que posteriormente es convertida en lípidos y triglicéridos (Grobbelaar, 2004). Las algas verdes pueden realizar un crecimiento heterótrofo además del autótrofo común de usar CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono donde las sustancias orgánicas actúan como nutriente orgánico esencial para el crecimiento (Pham, 2019). La fuente de carbono para las microalgas comúnmente es el CO<sub>2</sub>. Las microalgas utilizan el CO<sub>2</sub> disuelto en el medio acuoso por lo que la tasa de absorción de CO<sub>2</sub> y la biofijación son vitales para la fotosíntesis. Sin embargo, es importante que la cantidad de CO<sub>2</sub> se encuentre dentro de los límites (Nayak, 2011). Como se puede observar en la Figura 4C, en el cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua de origen acuícola, se determinó una remoción final casi entera de carbono orgánico total en el día 13. Este resultado estuvo parejo al de Ye (2020) y colaboradores, donde el carbono fue removido en un 96.07% en el tratamiento de agua residual.

Adicionalmente, en la Tabla 4 se muestra la remoción de otros nutrientes y metales, esto tomando en cuenta la concentración inicial (previo a la inoculación con *Scenedesmus* sp.), y al final del cultivo de la microalga en agua de origen acuícola. El calcio, sodio y potasio que están presentes en el agua, son esenciales como un componente importante de la materia viva y actúan como cofactores en las reacciones enzimáticas de microalgas (Khatoun et al., 2016). Sin embargo, deben tener límites; por ejemplo, la concentración no debe pasar de 0.1 μMolar de calcio, y respecto al potasio 1 μMolar para crecimiento óptimo (Olivares, 2010). En relación con el calcio, hubo una remoción del 18.75% pasando de una

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

concentración inicial de  $13.44 \pm 0.06$  a una final de  $10.92 \pm 0.05$  mg/L.

Los niveles elevados de metales pesados como el cobre y hierro, pueden ayudar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como superóxido, peróxido de hidrogeno, etc. Estos metales catalizan la formación de radicales hidroxilos, y los metales sin capacidad redox como el plomo mejoran la carga de ROS (Tripathi, 2014). Estos ROS de microalgas suelen estar involucradas en la señalización celular, así como en la oxidación o reducción de metales necesarios o tóxicos (Discroll, 2013). Sin embargo, los ROS producidos por microalgas, pueden afectarlas negativamente dañando el DNA y producir una necrosis celular (Ugya, 2019). En la Tabla 4 se muestra que la concentración de cobre no aumenta significativamente indicando una nula remoción. El estudio de Luu et al., (2019) demostró que la habilidad de remoción y acumulación de cobre está ligado a la concentración inicial del metal, e indicaron el potencial de *Scenedesmus* sp. en el tratamiento de aguas residuales (Pham, 2019). El estudio de Hassal (1962) reportó que las células muertas suelen retener más metales que las células vivas conjuntamente Yan (2002) indica una capacidad de desorción de metales por parte de las células vivas. De acuerdo al estudio de Sengar (2011) el cobre puede ser removido totalmente en el día 20 de cultivo lo que puede indicar que aumentando el tiempo de cultivo en este proyecto se pudo haber dado tal remoción.

El cromo presentó valores mínimos previo al inóculo con *Scenedesmus* sp. y posterior a los 13 días de cultivo, demostrando que este metal no tuvo altas concentración en el medio de cultivo. Además, que presenta buenos resultados en términos de remoción de Cr como lo confirma el estudio de Ajayan et al., (2015) donde existió una remoción de cromo de cerca del 100% en cultivo de *Scenedesmus* sp. en aguas residuales de tenería posterior a sus 12 días de cultivo.

Respecto al hierro, este metal presentó una disminución de concentración, mostrando

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

una remoción final de 57.52%. La remoción del hierro mediante *Scenedesmus* sp. se confirma en varias investigaciones como la de Apandi et al., (2022) en donde las concentraciones de Fe, Cd y Cr fueron acumuladas por la especie de manera efectiva a partir del cultivo de la especie en aguas residuales de mercado húmedo, y tuvo una remoción total después de los 18 días de cultivo.

Los valores de plomo fueron tan bajos que no se pudieron detectar en el rango. Sin embargo, existen ciertos estudios que indican que *Scenedesmus* sp. tiene la habilidad de remover 89% del plomo presente en medio acuoso (Pham et al., 2020). Es importante mencionar que la tasa de remoción depende de la concentración inicial del metal, duración a la exposición y especies de microalga. Las algas pueden absorber metales pasivamente como el plomo y estroncio, por polisacáridos cargados en la pared celular y la matriz intracelular (Fathi, 2002).

El molibdeno presentó un aumento de concentración. A pesar de que no hubo una remoción los datos se mantuvieron bajos. Sin embargo, se sabe que especies del género *Scenedesmus* se utilizan para remover molibdeno de sistemas acuosos (De Arellano, 2007).

Respecto al nitrógeno amoniacal tuvo un ligero aumento de concentración. Como menciona Guerrero (2014), las mayores fuentes de nitrógeno son nitratos y nitrógeno amoniacal. El nitrógeno amoniacal es usado como fuente de nitrógeno, así como en el cultivo de efluente de tilapia donde la concentración de este nutriente en la materia orgánica del agua completa los requerimientos de la célula para su crecimiento (Guerrero, 2014).

En el caso del Níquel su concentración no varía en el día inicial ni en el final. Sus rangos se encuentran por debajo del límite expuesto en estudios anteriores donde establecen que *Scenedesmus* sp. puede tolerar concentraciones de metales que oscilan entre 0.5 y 2 mg/L en el caso de cobre, níquel, cadmio y zinc (Shehata et al., 1980, Tripathi et al., 2019)

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

El potasio y sodio son requeridos para las microalgas actuando como activadores de enzimas y el potasio también participa en la osmorregulación (Abalde et al., 1995). En la Tabla 4 se observa concentraciones finales de  $61.95 \pm 3.84$  mg/L para potasio y  $37.40 \pm 3.03$  mg/L para sodio. En el estudio realizado por Vega (2022) menciona que, las concentraciones de sodio y potasio aumentan cuando existe una deficiencia en la fuente de carbono, por lo tanto, la microalga debe adoptar al bicarbonato que se encuentra en el medio.

Por medio del Anexo 1 del libro del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (MAE): Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso de agua. Se compararon los valores de límites de descarga a un cuerpo de agua dulce y los valores obtenidos en la Tabla 4. Las concentraciones de los nutrientes y metales descritos en el agua residual de origen acuícola posterior a los 13 días de cultivo con *Scenedesmus* sp. obtuvo resultados inferiores a los descritos por el ministerio. Asegurando límites permisibles en su concentración de metales y nutrientes que no afecten los cuerpos de agua dulce.

Al mismo tiempo que las microalgas absorben los nutrientes del agua ayudando en la biorremediación, forman lípidos que pueden ser extraídos con la ayuda de solventes como son metilciclohexano, acetato de etilo, etanol, cloroformo:metanol (1:2), hexano y metanol. El resultado de la productividad total de lípidos fue menor al obtenido por Nayak (2011) de  $0.025$  g/L\*d. Esto se puede deber a que el solvente utilizado cloroformo:metanol, tenía una relación (2:1) modificando también el método de Blight y Dyer (1959) al extraer los lípidos con esta mezcla y posteriormente separar en capas de cloroformo y metanol con la adición de metanol y agua terminando con una relación final de 2:2:1 de cloroformo:metanol:agua. Los datos obtenidos mostraron a cloroformo:metanol (1:2) como mejor solvente para la extracción de lípidos mediante biomasa seca.

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Los mejores solventes, por lo tanto, son las mezclas que contienen solventes polares y no polares, ya que los lípidos son extraídos por complejos de proteína-lípido en el solvente polar, y posterior los lípidos se disuelven en el solvente no polar (Abomohra, 2016). Esto se comprueba en el estudio de Ryckebosh (2012), en el cual compara ciertos solventes y comprueba que la mezcla cloroformo:metanol (1:1) tiene un porcentaje de extracción de 24% aproximadamente de lípidos en la especie *C. vulgaris* (Ryckebosh, 2012). En el estudio de Lee (2010) y colaboradores, la extracción lipídica de *Scenedesmus* sp. fue realizada con la mezcla cloroformo:metanol (1:1) modificando la versión de Bligh y Dyer donde se evaporaron los solventes, dio como resultado una productividad total de lípidos de 0.0095 g/L\*d semejante a la obtenida en el cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua acuícola.

Seguido del cloroformo:metanol (1:2), el siguiente mejor solvente fue el metanol. El metanol es un solvente con alta polaridad y junto con el etanol son utilizados en la producción de biodiesel (Yusoff, 2014), es el alcohol más utilizado en la producción de biodiesel debido a sus propiedades fisicoquímicos, bajo costo, condiciones de reacción suaves y fácil separación de fases (Ryckebosh, 2012). Podemos comparar el estudio realizado por Guasumba (2022) donde su segundo mejor solvente extractor de lípidos fue metanol en el cultivo realizado de *Scenedesmus* sp. en agua residual de cerveza alcanzando un valor de 16.44 %.

Por lo mencionado anteriormente se justifica que el etanol sea el tercer mejor solvente mostrando una extracción de 20.82%. En el estudio de Iqbal (2013), utilizan al cloroformo y etanol como co-solventes en un sistema de extracción asistida por microondas donde produjo un porcentaje de lípidos en peso seco del 53%. El calentamiento por microondas (MW) es una fuente de calor sin contacto, la cual calienta todo el volumen de la muestra simultáneamente, esta se ha utilizado para la extracción eficiente de lípidos de microalgas

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

utilizando solventes convencionales (Iqbal et al., 2013). En el estudio de Iqbal, se obtienen mejores resultados por la dinámica de los solventes utilizados, y por el método de extracción que aumenta la eficiencia (Virost et al., 2007).

El contenido de lípidos de las microalgas, sobre la base del peso celular seco, generalmente varía entre el 20% y el 40% (Rawat et al., 2013). Los tres solventes (cloroformo:metanol (1:2), metanol y etanol) fueron los que obtuvieron porcentajes mayores al 20% comprobando la hipótesis. Esto se debe a que los alcoholes polares interrumpen los enlaces de hidrógeno y a su vez, las fuerzas electrostáticas que existen entre los lípidos polares asociados a la membrana y proteína volviéndola porosa. Comúnmente se acompañan de un solvente no polar como el cloroformo el cual ingresa a la célula e interactúa con los lípidos hidrófobos (Du et al., 2015). Respecto a los porcentajes obtenidos mediante la biomasa húmeda, no cumplieron con el mínimo requerido de 20%. El etanol fue el solvente cuyo rendimiento de lípidos obtuvo el mejor porcentaje, seguido del metanol y hexano. La baja obtención de lípidos en la biomasa húmeda se debe a la barrera de agua que protege a los lípidos intracelulares la cual impide la ruptura de la pared celular de la microalga (Ghasemi et al., 2016).

Los lípidos provienen principalmente de la membrana plasmática, endomembranas, cloroplastos y cuerpos lipídicos donde se encuentran triglicéridos y ácidos grasos libres. Los lípidos se dividen en neutros y polares, y los ácidos grasos libres se encuentran en la clasificación de lípidos neutros (Cairós, 2021). En la extracción de ácidos grasos libres, el solvente hexano fue el que presentó el valor más alto. Los solventes con baja polaridad como el hexano suelen ser utilizados como disolventes orgánicos de extracción.

La síntesis de ácidos grasos ocurre en el cloroplasto. En donde, el primer paso es la conversión de malonil-CoA mediante la carboxilación de acetil-CoA, reacción que es

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

catalizada por acril-CoA carboxilasa el cual viene a ser un paso limitante en el proceso. Posterior a este paso, hay una adición descarboxilativa de malonil-CoA catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, con el objetivo de obtener moléculas de 16C y 18C saturadas (Salazar, 2012).

En el presente estudio realizado en agua de origen acuícola, el cloroformo:metanol (1:2) obtuvo un porcentaje de 35.67% de AGL, mientras que en el estudio de Bermúdez (2018) obtiene un total de AGL igual a 59.89% ocupando el mismo solvente en las mismas concentraciones. Los porcentajes difieren al cultivar a *Scenedesmus* sp. en medio BG11 el cual es óptimo para el crecimiento microalgal. Acetato de etilo fue el tercer mejor solvente, y presentó un total de AGL menor al obtenido por Nayak (2011) donde el porcentaje fue de 44.3% debido a que se hizo un cultivo de *Scenedesmus* sp. en medio BBM modificado que cuenta con nutrientes óptimos. Ninguno de los solventes logró un rendimiento mayor al 80% por lo que se niega la hipótesis. Dong (2013), establece que los ácidos grasos libres presentes en el aceite extraído de la biomasa de algas pueden alcanzar hasta el 84%. Sin embargo, puede implicar que, durante el crecimiento celular haya tenido un efecto citotóxico en las células. A su vez, indican que la transesterificación catalizada por ácido es menor a la de un catalizador básico (Dong et al., 2013). En este estudio solo se utilizaron catalizadores ácidos por lo que no se logró obtener el resultado deseado.

Respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos se utilizaron dos tipos de catalizadores; ácido sulfúrico y resina comercial. En FAME indirecto de biomasa seca con ácido sulfúrico como catalizador, el mejor solvente fue cloroformo metanol (1:2) con un porcentaje de FAME igual a 67% seguido de metilciclohexano y etanol. En la investigación de Mathimani (2021); donde se utiliza ácido sulfúrico como catalizador y el solvente utilizado fue cloroformo:metanol (2:1), presentó un porcentaje ligeramente mayor de FAME

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

de 69.5%.

La investigación de Medrano et al., (2022) y colaboradores, mostró un porcentaje de producción de FAME en cultivo de *Scenedesmus* sp. en aguas residuales de matadero de cerdos de 47%, con el solvente metilciclohexano. Este valor es menor al obtenido en la presente investigación lo cual puede deberse a los nutrientes presentes en el medio de cultivo.

En la Figura 7 se logra apreciar que los datos obtenidos de producción de FAME es mayor en biomasa seca utilizando ácido sulfúrico como catalizador. Según Matgimani (2021), el catalizador ácido es competente en la conversión de lípidos a FAME, y algunos investigadores corroboran que hay un mejor rendimiento de conversión de lípidos del catalizador ácido sobre otros. La biomasa húmeda presentó valores menores de FAME, esto debido a lo previamente mencionado respecto a las complejidades que presenta la biomasa y el porcentaje de agua presente en ella. El valor más alto se dio con el solvente cloroformo:metanol (1:2) semejante al estudio de Medrano et al., (2022) donde el valor obtenido es de 51.50%.

En los FAME obtenidos de AGL, se observan el porcentaje más altos, es de de 74.90% para cloroformo:metanol (1:2) rechazando la hipótesis de obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos superior al 90%. El trabajo de Dong et al., (2013) establece que la producción de FAME es mejor si se realiza *in situ* utilizando como catalizador a Ambely st-15 que mediante el proceso *in situ* catalizado por ácido o base. Además, que se podría reciclar el catalizador minimizando gastos (Dong, 2013).

En la Figura 8 se observó la cromatografía de capa fina donde según la Tabla 5, el factor de retención del control fue de 0.77, para AGL fue de 0.53 y para FAME de 0.63. Según Ferrari (2005), los factores de retención adecuados serían 0.4 para ácidos grasos, y 0.71 para ésteres de ácidos grasos. Cabe recalcar que las muestras de biodiesel del estudio de

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Ferrari (2005), fueron obtenidos a partir de aceite de soja neutro utilizado en frituras. En la presente investigación se obtuvieron resultados cercanos, sugiriendo que en las respectivas muestras se obtuvieron las moléculas deseadas. Adicionalmente, la existencia de ésteres de ácidos grasos de C16-C18 es característica en biocombustibles como el biodiesel y debe ser comprobada mediante el perfil de ácidos grasos.

Los estudios del cultivo de la especie *Scenedesmus* sp en agua residual de origen acuícola, así como el uso de los seis solventes extractores son pocos, por lo que, el uso de bibliografía previa a los últimos años fue necesaria.

### **5 CONCLUSIONES**

- Se obtuvo un crecimiento adecuado mediante el uso de agua residual de origen acuícola como medio acuoso para el cultivo de *Scenedesmus* sp. La productividad volumétrica tuvo un rendimiento de 0.041 g/L\*d siendo un valor alto en comparación con las bibliografías consultadas, la productividad específica tuvo valores de 0.077 d<sup>-1</sup> semejantes a los obtenidos en otros estudios.
- De igual manera, la especie *Scenedesmus* sp. demostró sus capacidades de remoción de nutrientes logrando concentraciones finales de nutrientes y metales dentro de los parámetros de descarga como efluente en cuerpos de agua dulce según la normativa ambiental ecuatoriana vigente.
- El porcentaje de extracción de lípidos superó al 20% esperado con la ayuda de los solventes cloroformo:metanol (1:2), metanol y etanol en biomasa seca. Sin embargo, la producción de AGL y FAME no llegaron a los valores esperados siendo estos de 80 y 90%, respectivamente. A pesar de no haber obtenido los porcentajes deseados, el medio acuoso demostró ser óptimo para el crecimiento de esta especie, y con modificaciones en las condiciones de cultivo y en la

# **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

extracción de AGL y FAME se podrían llegar a los valores deseados.

## **6 RECOMENDACIONES**

- En esta investigación no se realizó reposición de nutrientes durante el tiempo de cultivo. Algunos autores sugieren que la reposición de nutrientes puede incrementar la producción de lípidos. Respecto a la extracción de lípidos es recomendable probar nuevas mezclas de solventes con partes polares y apolares como puede ser hexano-metanol, cloroformo-etanol, entre otros (Quevedo, 2018).
- La inclusión de nueva metodología para lípidos como la mencionada de microondas puede mostrar diferencias significativas a la hora de la extracción de estos. Así mismo, la bibliografía utilizada permitió conocer nuevas metodologías para FAME donde habla de una transesterificación *in situ* que sugiere ser mejor con la ayuda de catalizador Ambely st-15 (Dong et al., 2013).

## **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.

## **8 BIBLIOGRAFÍA**

Abdullah, B., Syed Muhammad, S. A. F., 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, 37–50.

Abomohra, A. E. F., Jin, W., & El-Sheekh, M. (2016). Enhancement of lipid extraction for improved biodiesel recovery from the biodiesel promising microalga *Scenedesmus obliquus*. *Energy Conversion and Management*, 108, 23-29.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Ajayan, K. V., Selvaraju, M., Unnikannan, P., & Sruthi, P. (2015). *Phycoremediation of Tannery Wastewater Using Microalgae Scenedesmus Species*. *International Journal of Phytoremediation*, 17(10), 907–916.

Alalwan, H. A., Alminshid, A. H., & Aljaafari, H. A. (2019). Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable Energy Focus*, 28, 127-139.

Andrade, C. E., Vera, A. L., Cárdenas, C. H., & Morales, E. D. (2009). Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 32(2), 126-134.

Apandi, N. M., Gani, P., Sunar, N. M., Mohamed, R. M. S. R., AlGheethi, A., Apandi, A. M., ... & Rahman, R. A. (2022). *Scenedesmus* sp. Harvesting by Using Natural Coagulant after Phycoremediation of Heavy Metals in Different Concentrations of Wet Market Wastewater for Potential Fish Feeds. *Sustainability*, 14(9), 5090.

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>

Bermudez-Sierra, J. J. (2018). Lipid Extraction Of The Microalga *Scenedesmus* Sp. With Different Mixture Of Organic Solvents. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 16(2), 88-98.

Boyd, C. E., & Tucker, C. S. (2012). *Pond aquaculture water quality management*. Springer Science & Business Media.

Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

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

Cairós Regalado, H. S. (2021). Obtención de lípidos estructurados a partir de microalgas.

Camacho Solis, L. P., & Malca Esquerre, M. N. (2019). Biofiltración a base de microalgas termófilas y mesófilas para absorber dióxido de carbono del aire, Lima 2019.

Chia, M. A., Lombardi, A. T., Da, M., & Melão, G. G. (2013). Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *An Acad Bras Cienc*, 85(4).

<https://doi.org/10.1590/0001-3765201393312>

Chowdhury, H., & Loganathan, B. (2019). *3rd generation biofuels from microalgae: A review. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. doi:10.1016/j.cogsc.2019.09.003

Debnath, C., Bandyopadhyay, T. K., Bhunia, B., Mishra, U., Narayanasamy, S., & Muthuraj, M. (2021). Microalgae: Sustainable resource of carbohydrates in third-generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 150, 111464.

De Arellano, G. A. V. R. (2007). Utilización de microalgas para la remoción de Cadmio y Zinc en efluentes de aguas residuales urbanas. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

Dhanya, B. S., Mishra, A., Chandel, A. K., & Verma, M. L. (2020). Development of sustainable approaches for converting the organic waste to bioenergy. *Science of The Total Environment*, 138109.

Dong, T., Wang, J., Miao, C., Zheng, Y., & Chen, S. (2013). Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content. *Bioresource*

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

*Technology*, 136, 8-15.

Driscoll, W. W., Espinosa, N. J., Eldakar, O. T., & Hackett, J. D. (2013). Allelopathy as an emergent, exploitable public good in the bloom-forming microalga *Prymnesium parvum*. *Evolution*, 67(6), 1582-1590.

Du, Y., Schuur, B., Kersten, S. R. A., & Brilman, D. W. F. (2015). *Opportunities for switchable solvents for lipid extraction from wet algal biomass: An energy evaluation*. *Algal Research*, 11, 271–283.

Mamallacta Tanguila, A. A. (2021). *La rentabilidad económica y la eficiencia de las empresas piscícola en la provincia de Pastaza-Ecuador* (Bachelor's thesis).

Fangrui Ma, M. A. H. (n.d.). *Biodiesel production: a review I Related papers Biodiesel product ion: a review I Fangrui Ma a Preparat ion and charact erizat ion of bio-diesels from various bio-oils Rachel Burt on Opt imizat ion of Base-Cat alyzed Transest erificat ion in Biodiesel Pro.*

Fathi, A. A. (2002). Toxicological response of the green alga *Scenedesmus bijuga* to mercury and lead. *Folia microbiologica*, 47(6), 667-671.

Ghasemi Naghdi, F., González González, L. M., Chan, W., & Schenk, P. M. (2016). Progress on lipid extraction from wet algal biomass for biodiesel production. *Microbial biotechnology*, 9(6), 718-726.

Grobbelaar JU. 2004. Algal nutrition: mineral nutrition, pp. 97-115. In Richmond A (ed.). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford

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

Guerrero-Cabrera, L., Rueda, J. A., García-Lozano, H., & Navarro, A. K.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

(2014). Cultivation of *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. algae in Batch culture using Nile tilapia effluent. *Bioresource Technology*, 161, 455–460.

Iqbal, J., & Theegala, C. (2013). Microwave assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent. *Algal Research*, 2(1), 34–42.

J.M. Marchetti, V. U. M. et al. (2007). *Sci-Hub / Possible methods for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11(6), 1300–1311 / 10.1016/j.rser.2005.08.006. Possible Methods for Biodiesel Production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.rser.2005.08.006>

Julio Abalde, Angeles Cid, J.Pablo Fidalgo, Enrique Torres, Concepción Herrero. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*

Karakurt, I., & Aydin, G. (2023). Development of regression models to forecast the CO<sub>2</sub> emissions from fossil fuels in the BRICS and MINT countries. *Energy*, 263, 125650.

Khatoun, H., Banerjee, S., Syakir Syahiran, M., Mat Noordin, N. B., Munafi Ambok Bolong, A., & Endut, A. (2016). Re-use of aquaculture wastewater in cultivating microalgae as live feed for aquaculture organisms. *Desalination and Water Treatment*, 57(60), 29295-29302.

Kurniawan, S. B., Abdullah, S. R. S., Imron, M. F., Ahmad, A., Mohd Said, N. S., Mohd Rahim, N. F., ... Purwanti, I. F. (2021). Potential of valuable materials recovery from aquaculture wastewater: An introduction to resource reclamation. *Aquaculture Research*, 52(7), 2954–2962. doi:10.1111/are.15180

Kurniawan, S. B., Abdullah, S. R. S., Othman, A. R., Purwanti, I. F., Imron, M. F., Ahmad, A., & Hasan, H. A. (2021). Isolation and characterisation of biofloculant-producing bacteria from aquaculture effluent and its performance in treating high turbid water. *Journal of Water Process Engineering*, 42, 102194.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., & Oh, H.-M. (2010). *Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Bioresource Technology, 101(1), S75–S77*

Mamallacta Tanguila, A. A. (2021). *La rentabilidad económica y la eficiencia de las empresas piscícola en la provincia de Pastaza-Ecuador* (Bachelor's thesis).

Mat Aron, N. S., Khoo, K. S., Chew, K. W., Show, P. L., Chen, W. H., & Nguyen, T. H. P. (2020). Sustainability of the four generations of biofuels—a review. *International Journal of Energy Research, 44(12), 9266-9282*

Mathimani, T., Sekar, M., Shanmugam, S., Sabir, J. S., Chi, N. T. L., & Pugazhendhi, A. (2021). Relative abundance of lipid types among *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. and ameliorating homogeneous acid catalytic conditions using central composite design (CCD) for maximizing fatty acid methyl ester yield. *Science of The Total Environment, 771, 144700*.

Medrano-Barboza, J., Herrera-Rengifo, K., Aguirre-Bravo, A., Ramírez-Iglesias, J. R., Rodríguez, R., & Morales, V. (2022). Pig slaughterhouse wastewater: medium culture for microalgae biomass generation as raw material in biofuel industries. *Water, 14(19), 3016*.

Mobin, S., & Alam, F. (2014, December). Biofuel production from algae utilizing wastewater. In 19th Australasian Fluid Mechanics Conference. Melbourne, Australia.

Mofijur, M., Rasul, M. G., Hassan, N. M. S., & Nabi, M. N. (2019). Recent development in the production of third generation biodiesel from microalgae. *Energy Procedia, 156, 53-58*.

Morillas-España, A., Sánchez-Zurano, A., Lafarga, T., del Mar Morales-Amaral, M., Gómez-Serrano, C., Acién-Fernández, F. G., & González-López, C. V. (2021). Improvement of wastewater treatment capacity using the microalga *Scenedesmus* sp. and membrane

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

bioreactors. *Algal Research*, 60, 102516.

Nayak, M., Jena, J., Bhakta, S., Rath, S. S., Sarika, C., Rao, B. V. S. K., ... 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.

Olivares, R. (2010). Producción de aceite para usos industriales a partir de la microalga *Scenedesmus Obliquus*.

Omotade, X., Funmilola, I., Alatise, X., & Olanrewaju, M. Olugbenga, O. (2019). Growth and yield performance of hot pepper using aquaculture wastewater. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 21, 18–25.

Paula, E. R., Johanna, M. B., Alberto, A. B., Rubén, R. I. J., Carlos, N. J., & Jennifer, M. (2022). Isolation, Identification, and Evaluation of the Lipid Content of *Desmodesmus communis* from the Ecuadorian Amazon. *BioEnergy Research*, 1-12.

Pham, T. L. (2019). Removal and bioaccumulation of copper by the freshwater green alga *Scenedesmus* sp. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 61(2), 65-70.

Pham, T. L., & Bui, M. H. (2020). Removal of nutrients from fertilizer plant wastewater using *Scenedesmus* sp.: formation of bioflocculation and enhancement of removal efficiency. *Journal of Chemistry*, 2020.

Pham, T. L., Dao, T. S., Bui, H. N., Pham, T. K. N., Ngo, T. T. H., & Bui, H. M. (2020). Lipid production combined with removal and bioaccumulation of Pb by *Scenedesmus* sp. *Green Alga. Polish Journal of Environmental Studies*, 29(2), 1785-1791.

Quevedo, C., Morales, S. P., & Acosta, A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae*, 15(1), 25-31.

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Quishpe Jadán, M. A. (2018). Estudio comparativo de tres fertilizantes agrícolas sobre el crecimiento composición bioquímica de *Scenedesmus* Sp. UGB-RJ3009 en cultivos discontinuos (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil).

Ramos Suárez, J. L. (2014). Producción de biogás a partir de biomasa de la microalga *scenedesmus* sp. procedente de diferentes procesos (Doctoral dissertation, Agronomos).

Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, 103, 444–467.

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

Ryckebosch, E., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(2), 189-198.

Salazar Pérez, L. E. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para producción de biodiesel.

Sengar, R. M. S., Singh, K. K., & Singh, S. (2011). Application of phycoremediation technology in the treatment of sewage water to reduce pollution load. *Indian Journal of Scientific Research*, 2(4), 33-39.

Sharma, J., Kumar, S. S., Bishnoi, N. R., & Pugazhendhi, A. (2018). Enhancement of lipid production from algal biomass through various growth parameters. *Journal of Molecular Liquids*.

Shehata, S. A., & Badr, S. A. (1980). Growth response of *Scenedesmus* to different concentrations of copper, cadmium, nickel, zinc, and lead. *Environment International*, 4(5-6), 431–434.

## **OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Sonnino, A., & Ruane, J. (2013). La innovación en agricultura como herramienta de la política de seguridad alimentaria: el caso de las biotecnologías agrícolas. *Biotecnologías e innovación: el compromiso social de la ciencia*, 25-52.

Stamenković, O. S., Veličković, A. V., & Veljković, V. B. (2011). The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. *Fuel*, 90(11), 3141-3155.

Subía, S., & Rubio, J. (2018). Evaluación de biomasa de microalgas de la laguna Limoncocha como materia prima para la obtención de biocombustibles. *Enfoque UTE*, 9(2), 106-116.

Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1989). Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environmental Pollution*, 58(1), 19–34. doi:10.1016/0269

Tanzi, C. D., Abert, M., Chemat, F., & Vian, M. A. (2013). New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.168>

Tejido-Nuñez, Y., Aymerich, E., Sancho, L., & Refardt, D. (2020). Co-cultivation of microalgae in aquaculture water: Interactions, growth and nutrient removal efficiency at laboratory-and pilot-scale. *Algal research*, 49, 101940.

Tripathi, B. N., & Gaur, J. P. (2004). Relationship between copper-and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta*, 219(3), 397-404.

Tripathi, R., Gupta, A., & Thakur, I. S. (2019). An integrated approach for phycoremediation of wastewater and sustainable biodiesel production by green microalgae, *Scenedesmus* sp. ISTGA1. *Renewable Energy*, 135, 617–625. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2018.12.056>

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

Ugya, A. Y., Imam, T. S., Li, A., Ma, J., & Hua, X. (2019). Antioxidant response mechanism of freshwater microalgae species to reactive oxygen species production: a mini review. *Chemistry and Ecology*, 1–20.

Valdés, Y. N. (2021). Determinación de los parámetros adecuados para la simulación del proceso de crecimiento de la microalga: e25. *Revista Estudiantil Nacional de Ingeniería y Arquitectura*, 2(3).

Valera, S. J. (2008). Remoción de nutrientes inorgánicos con microalgas coinmovilizadas en quitosano.

Vega Ayala, A. S. (2022). Obtención de lípidos a partir de biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de origen acuícola.

Villarreal Lozada, G. S. (2020). Estudio comparativo de dos medios de cultivo (guillard f/2 vs. medio erd-schreiber) y su efecto en el crecimiento de diatomeas del sector de Mar Bravo-provincia de Santa Elena (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2020).

Virost, M., Tomao, V., Colnagui, G., Visinoni, F., & Chemat, F. (2007). New microwave-integrated Soxhlet extraction: an advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of chromatography A*, 1174(1-2), 138-144.

Yan, H., & Pan, G. (2002). Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*, 49(5), 471-476.

Yusoff, M. F. M., Xu, X., & Guo, Z. (2014). Comparison of fatty acid methyl and ethyl esters as biodiesel base stock: a review on processing and production requirements. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(4), 525-531.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

**9 ANEXOS**

Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce

<b>Parámetros Físicoquímicos</b>	<b>Límite máximo permisible</b>	<b>Expresado como</b>
Calcio (mg/L)	30	Ca
Cobre (mg/L)	1	Cu
Cromo (mg/L)	0.5	Cr
Hierro Total (mg/L)	10	Fe
Molibdeno (mg/L)	0.07	Mo
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	30	N
Níquel (mg/L)	2	Ni
Plomo (mg/L)	0.2	Pb
Demanda Química de oxígeno (mg/L)	250	DQU
Sodio (mg/L)	200	Na
Nitrógeno Total (mg/L)	15	N
Fósforo Total (mg/L)	10	P

Obtenido de: Revisión del Anexo 1 del libro del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA): Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso de agua.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

**ANEXO 2**

Crecimiento celular de *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual de origen acuícola y

medio BBM

**Crecimiento Celular**

Días	Conteo Celular (cel/mL)		Densidad Óptica (680 nm)		Peso Seco (g/L)	
	Agua de Origen Acuícola	Medio BBM	Agua de Origen Acuícola	Medio BBM	Agua de Origen Acuícola	Medio BBM
<b>0</b>	2.32E+04 ± 3.20E+03	1.89E+04 ± 2.12E+02	0.165 ±0.004	0.178 ± 2.08E-03	0.003 ± 0.004	0.003 ± 7.07E-05
<b>1</b>	5.97E+04 ± 2.21+0.2	7.054E+05 ± 7.38E+02	0.301 ± 0.001	0.224 ± 3.06E-03	0.0037 ± 0.004	0.003 ± 3.18E-03
<b>2</b>	5.55E+04 ± 1.71+04	7.356E+05 ± 3.61E+01	0.379 ± 0.017	0.319 ± 8.02E-03	0.000325 ± 0.000	0.003 ± 1.06E-03
<b>3</b>	1.23E+05 ± 2.21E+0.3	8.254E+05 ± 4.10E+01	0.761 ± 0.007	0.354 ± 1.21E-03	0.0033 ± 0.001	0.004 ± 1.20E-03
<b>4</b>	2.16E+05 ± 3.87E+04	9.303E+05 ± 3.54E+00	0.863 ± 0.039	0.410 ± 1.77E-02	0.00335 ± 0.001	0.006 3.82E- 03
<b>5</b>	2.77E+05 ± 2.65+04	1.713E+05 ± 1.58E+02	0.879 ± 0.060	0.611 ± 3.21E-03	0.00315 ± 0.001	0.007 ± 3.54E-04
<b>6</b>	6.60E+05 ± 2.32E+04	1.833E+06 ± 9.19E+00	1.310 ± 0.035	0.771 ± 5.77E-04	0.00335 ± 0.000	0.007 1.57E- 16
<b>7</b>	6.95E+05 ± 3.65E+04	1.906E+06 ± 8.49E+00	1.563 ± 0.017	1.054 ± 5.77- 05	0.00375 ± 0.003	0.011 ± 4.24E-04
<b>8</b>	7.20E+05 ± 7.73E+04	1.965E+06 ± 4.31+01	1.639 ± 0.038	1.324 ± 1.53E-03	0.0038 ± 0.002	0.011 ± 1.41E-04
<b>9</b>	8.76E+05±6.96E+04	2.013E+06 ± 1.05E+02	1.691 ± 0.100	1.514 ± 1.00E-03	0.00465 ± 0.001	0.011 ± 1.20E-03
<b>10</b>	1.89E+06±1.77E+05	2.326E+06 ± 2.21E+02	1.869 ± 0.037	1.554 ± 1E- 03	0.00435 ± 0.001	0.013 ± 1.41E-03
<b>11</b>	2.23E+06±1.77+05	2.883E+06 ± 1.66E+04	1.729 ± 0.002	1.472 ± 5.20E-04	0.00455 ± 0.000	0.013 ± 1.41E-03
<b>12</b>	2.30E+06±1.44E+05	3.072E+06 ± 1.84E+01	1.379 ± 0.074	1.513 ± 1.05E-03	0.0059 ± 0.003	0.011 ± 7.07E-05
<b>13</b>	2.30E+06±2.65E+05	2.916E ± 3.68E+01	1.246 ± 0.032	1.439 ± 5.77E-04	0.00705 ± 0.000	0.010 ± 2.12E-04

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL DE  
*Scenedesmus* sp. CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN ACUÍCOLA**

ANEXO 3

**Concentración de Nitrógeno Total, Fósforo Total y Carbono Orgánico Total**

Días	Nitrógeno Total (g/L)		Fósforo Total (g/L)		Carbono Orgánico Total (g/L)	
	Agua de Origen Acuícola	Medio BBM	Agua de Origen Acuícola	Medio BBM	Agua de Origen Acuícola	Medio BBM
<b>0</b>	168 ± 1.41	45.5 ± 2.12	75.5 ± 0.71	116.05 ± 2.90	726.5 ± 12.02	59 ± 1.41
<b>1</b>	162 ± 4.24	38 ± 0	63.35 ± 3.18	113.95 ± 4.45	670 ± 28.28	46.5 ± 7.78
<b>2</b>	32 ± 0	31.5 ± 0.71	58.5 ± 2.12	111.4 ± 2.40	612.5 ± 10.61	40 ± 2.83
<b>3</b>	39 ± 16.97	28 ± 0	55.1 ± 0.57	110.55 ± 3.61	533 ± 21.21	30 ± 8.49
<b>4</b>	25.5 ± 0.71	26.5 ± 0.71	34.04 ± 0.21	83.7 ± 14.28	443 ± 7.07	41.5 ± 7.78
<b>5</b>	13 ± 4.24	27.5 ± 0.71	29.15 ± 0.07	81.15 ± 35.57	308 ± 2.12	39.5 ± 2.12
<b>6</b>	12.5 ± 0.71	1.5 ± 0.71	25.55 ± 2.05	94.36 ± 35.57	253 ± 0	34.5 ± 19.09
<b>7</b>	6.5 ± 2.12	17.5 ± 0.71	14.7 ± 0	92.8 ± 35.71	158.5 ± 24.75	21 ± 1.41
<b>8</b>	4 ± 0	15.5 ± 2.12	7.45 ± 0.21	92.8 ± 5.66	121 ± 15.56	18.5 ± 0.71
<b>9</b>	4.6 ± 0.57	12.5 ± 0	6.5 ± 0.57	77 ± 6.65	111.5 ± 0.71	17 ± 1.41
<b>10</b>	4.5 ± 0.71	12 ± 0	5.65 ± 0.21	86.55 ± 17.61	92.5 ± 3.54	16 ± 1.41
<b>11</b>	4 ± 0.07	11.5 ± 0.71	4.1 ± 0.14	105.85 ± 3.04	72 ± 1.41	16 ± 2.83
<b>12</b>	4.75 ± 0.07	11 ± 0	2.25 ± 1.20	96.45 ± 3.61	52.5 ± 0.71	15 ± 1.41
<b>13</b>	4 ± 4.24	9.5 ± 0.071	1.6 ± 0.42	79.9 ± 7.78	37 ± 0	16 ± 1.41