

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL
CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO**

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO”**

Realizado por:

PAULA VALERIA ESTRADA DONOSO

Director del Proyecto:

Ph.D. (c) Johanna Lucía Medrano Barboza

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 27 de marzo de 2023

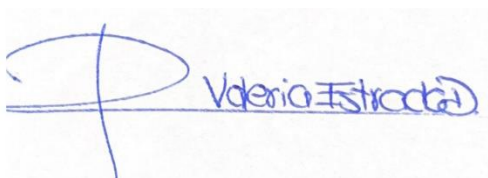
**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL
CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO**

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, PAULA VALERIA ESTRADA DONOSO, con cédula de identidad # 175189534-1, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado en ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

1751895341

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL
CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO”**

Realizado por:

PAULA VALERIA ESTRADA DONOSO

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 DE CONSORCIO MICROALGAL
CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

MSc. Susana E. Chamorro Arias

PhD. Alberto Alejandro Aguirre Bravo

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, marzo de 2023

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del programa de

Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

Energía, Ambiente y Biotecnología

Perteneciente a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a Dios, ya que, gracias a él, de su mano y con su guía durante todos estos años he logrado finalizar mi carrera, ha sido luz y amor durante cada minuto a lo largo de esta etapa y gracias a él soy la persona que soy y estoy en este camino culminando una gran meta. Sin duda su presencia en mi vida es luz, amor, paz, fuerza y lo mejor que me ha pasado.

A mis padres y hermanos que han sido mi apoyo y fortaleza cada día, me han motivado con su amor, sabiduría, paciencia, enseñanzas y orientación; mi madre y mejor amiga Marina Donoso que ha sido mi guía y el mejor ejemplo de lucha, dedicación, empeño y fortaleza, siempre con su amor y ánimo en todo momento, mi padre Andres Vázquez quien me ha motivado con su comprensión, apoyo y compañía durante cada día; son para mi ejemplo de lucha y fe en cada momento de la vida y agradezco todos los principios y valores con los que me han formado, por su presencia y amor incondicional a lo largo de este hermoso camino recorrido, son mi luz y fuerza.

A mi familia y amigos quienes han impulsado mis estudios y me han acompañado durante estos años en todo momento, amigos que se hicieron familia como el Dr. Oscar Delgado que ha sido un apoyo fundamental durante este tiempo demostrándome la bondad y fuerza que existe en su corazón.

A mi tutora Dra. Johanna Medrano que me ha brindado su conocimiento, tiempo y cariño en el transcurso de mis estudios como docente y aún más como guía en el presente trabajo. A mis

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

amigos, docentes y compañeros que han sido apoyo y soporte durante todo este proceso con su motivación y cariño representando en cada día de mi vida universitaria luz y felicidad.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios quien me ha guiado, acompañado y brindado la oportunidad de estar culminando esta meta tan importante en mi vida. A mis padres que han hecho esto posible con su apoyo y amor durante todos estos años. Han sido luz, compañía y fuerza en todo momento y agradezco siempre su presencia.

La vida, amor y salud de mis padres, hermanos, familia, amigos y docentes que han caminado conmigo a lo largo de esta maravillosa etapa y me han llenado de conocimiento y sabiduría en diferentes aspectos y momentos. Gracias por siempre ser sinónimo de lucha, perseverancia y felicidad, por tener las palabras correctas y ser luz en cada momento de mi vida.

Mi tutora Dra. Johanna Medrano que ha sido una guía fundamental durante este proceso compartiéndome su conocimiento y brindándome su paciencia, apoyo y dedicación a lo largo de esta investigación; a todos mis docentes quienes han fomentado en mí el deseo de superación y me han llenado de conocimiento en cada clase impartida, por los lindos momentos compartidos y por siempre ser un apoyo incondicional.

Agradecer a todos los docentes y autoridades de la Universidad Internacional SEK quienes me han acompañado a lo largo de mi vida universitaria, los cuales me han llenado de conocimientos y aprendizajes tanto académicos como también personales para convertirme en una profesional exitosa, recordándome siempre que se puede aprender en todo momento y de cada situación y sobre todo que con amor y perseverancia se llega lejos.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL
CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO**

Para someter a:

To be submitted:

Paula Valeria Estrada Donoso¹, Johanna Lucía Medrano Barboza^{1*}, Susana Chamorro

Arias, Alberto Alejandro Aguirre Bravo

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO
MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO”**

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador. 27/03/2023

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: PhD (c) Johanna Lucia 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 DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

RESUMEN

El agua residual de faenamiento porcino presenta sólidos disueltos en su composición y grandes cantidades de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Su carga orgánica representa un medio de cultivo prometedor para diferentes especies de microalgas. El objetivo de la presente investigación fue usar el agua residual de faenamiento porcino como medio de cultivo para un consorcio microalgal compuesto por las especies *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*, garantizando la biofijación del CO₂, producción de biomasa, extracción lipídica y proyectándose a la producción de biocombustibles de tercera generación como una alternativa prometedora de fuente de energía sustentable y al mismo tiempo realizar biorremediación en cuerpos de agua. Se determinó el rendimiento lipídico a partir del consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino en fotobiorreactores planos bajo las condiciones atmosféricas de la ciudad de Quito. Se midió su crecimiento celular en términos de densidad óptica, conteo celular y peso seco, obteniendo 0,54 g/L de biomasa total con una productividad específica de 0,077 d⁻¹. Se analizaron los parámetros fisicoquímicos del agua, obteniendo un porcentaje de remoción de 91,83% de Nitrógeno Total (NT), 80,48% de Fósforo Total (FT) y 79,03% de Carbono Orgánico Total (COT). Se determinó una producción lipídica de 30,54% usando metilciclohexano como solvente y biomasa seca, una producción de ácidos grasos libres (AGL) de 41,04% con cloroformo:metanol (1:2) y la obtención de 28,92% de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) con ayuda de ácido sulfúrico como catalizador homogéneo a partir de la biomasa directa en seco. Esta investigación demuestra la eficiencia del agua residual de faenamiento porcino para la obtención de biomasa y producción de lípidos a partir de consorcios de microalgas; sin embargo, no es apta para la

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

obtención de AGL y FAME de forma eficiente, lo cual puede mejorarse modificando las condiciones del cultivo.

Palabras clave: *Scenedesmus* sp., *Chlorella vulgaris*, agua residual de faenamiento porcino, remoción de nutrientes, biorremediación, lípidos.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

ABSTRACT

Wastewater from pig slaughter has dissolved solids in its composition and large amounts of organic and inorganic nutrients. Its organic load represents a promising culture medium for different species of microalgae. The objective of this research was to use wastewater from pig slaughter as a culture medium for a microalgal consortium formed by *Scenedesmus* sp. and *Chlorella vulgaris*, guaranteeing CO₂ biofixation, biomass production, lipid extraction and projecting to the production of third generation biofuels as a promising alternative sustainable energy source and at the same time perform bioremediation in water bodies through the removal of nutrients. The lipid yield was determined from the microalgal consortium grown in wastewater from pig slaughter in flat photobioreactors under the atmospheric conditions of Quito. Cell growth was measured in terms of optical density, cell count and dry weight, obtaining 0.54 g/L of total biomass with a specific productivity of 0.077 d⁻¹. The physicochemical parameters of the water were analyzed, obtaining a removal percentage of 91.83% of Total Nitrogen (NT), 80.48% of Total Phosphorus (FT) and 79.03% of Total Organic Carbon (TOC). A lipid production of 30.54% was determined using methylcyclohexane as solvent and dry biomass, a production of free fatty acids (FFA) of 41.04% with chloroform: methanol (1:2) and obtaining 28,92% of fatty acid methyl esters (FAME) with the help of sulfuric acid as a homogeneous catalyst directly in dry. This research demonstrates the efficiency of pig slaughter wastewater for biomass and lipid production from a microalgal consortium; however, it is not suitable for obtaining FFA and FAME efficiently, which can be improved by modifying culture conditions.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Key words: *Scenedesmus* sp., *Chlorella vulgaris*, wastewater from pig slaughter, nutrient removal, bioremediation, lipids.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

1. INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles datan desde hace muchos años atrás cuando se utilizaban gases o aceites vegetales como los aceites de ballenas para iluminar las principales ciudades europeas y americanas; sin embargo, los combustibles fósiles se convirtieron en dominantes a finales del siglo XX dados los inventos del motor de combustión interna, producción masiva, reducción de costos y abastecimiento de petróleo (Ramos, Díaz & Villar, 2016).

Debido a la crisis del mercado del petróleo y la preocupación mundial que cada día incrementa por el cambio climático, los biocombustibles han vuelto a ser una alternativa y a cobrar importancia; con el propósito de evitar el deterioro de los ecosistemas, asegurar sostenibilidad energética y una solución ante el agotamiento de las reservas de hidrocarburos.

La obtención de biocombustibles se genera a partir de biomasa y esta tiene varias clasificaciones y formas de producción, existe así la biomasa de primera generación (1G) conformada a partir de materias primas de origen agrícola tales como las semillas oleaginosas (Subía & Rubio, 2018), biomasa de segunda generación (2G) que emplea materias primas agrícolas y forestales como la celulosa que se obtiene del trigo y aserrín. La biomasa de tercera generación (3G) se constituye, a partir de materias primas de crecimiento rápido, que no son destinadas a la alimentación y se componen de biomoléculas de alta densidad energética como los microorganismos. (Subía & Rubio, 2018). Existe biomasa de cuarta generación (4G) tratan de explorar y explotar la construcción y diseño de sistemas biológicos modificados genéticamente de las algas y cianobacterias para la producción de bioenergía; ellas serán las encargadas de realizar todo el proceso de producción a diferencia de las otras generaciones que hacen parte del proceso únicamente, se busca modificar genéticamente su eficiencia fotosintética, reducir la fotoinhibición

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

y mejorar la penetración de luz, además, que con estas modificaciones podrían aumentar su contenido lipídico y de carbohidratos siendo muy favorable en la producción de biocombustibles, el riesgo al trabajar con estas algas modificadas genéticamente es la liberación de cepas transgénicas al medio ambiente (Romero,2020) . La biomasa de tercera generación (3G), es considerada una opción laudable como fuente de energía sostenible, provienen de fuentes microbianas y algas, superan las debilidades de las de primera (1G) y segunda (2G) generación, no son necesarias extensiones de terrenos agrícolas, ya que, los estanques o reactores donde se cultiven pueden estar en tierras improductivas; siempre y cuando se mantengan las condiciones de crecimiento adecuadas dependiendo de la fuente y especie (Escobedo & Calderón, 2021). Dentro de esta generación (3G) las microalgas son estudiadas como la fuente más característica y prometedora para producir biocombustibles con mayor rendimiento y menor agotamiento de recursos; ya que son organismos fotosintéticos que emplean la energía lumínica para crecer y asimilan el CO₂ atmosférico de manera más eficaz a comparación de las plantas terrestres (Escobedo & Calderón, 2021).

Las microalgas son un grupo múltiple de organismos autótrofos unicelulares, coloniales y filamentosos que se localizan en numerosos hábitats naturales, muchas de las microalgas estudiadas son fotosintéticas, capaces de realizar fotosíntesis aerobia, lo que quiere decir que pueden convertir la energía proveniente de la luz en energía química; solo se conoce que un pequeño grupo de ellas crecen mixotróficamente o heterotróficamente (Bux & Chisti, 2016). Tienen un tamaño de 2 – 200 µm aproximadamente, su hábitat es sumergido en un ambiente acuoso por lo que tienen una gran relación superficie – volumen, situación que les posibilita absorber una gran cantidad de CO₂ y nutrientes presentes; así también, mediante fotosíntesis transformar la energía solar en abundante cúmulo de biomasa microalgal la cual contiene proteínas, lípidos y

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

carbohidratos, demostrando ser prometedoras y un recurso energético para obtener biocombustibles (Escobedo & Calderón, 2021).

El beneficio de estos microorganismos es su composición lipídica (oscila entre 20 y 50 % en peso seco), proteica y de carbohidratos; son una fuente importante de biomoléculas y metabolitos que pueden ser destinados en diferentes aplicaciones biotecnológicas generando un beneficio económico y energías alternativas que necesitan una menor superficie que otros cultivos agrícolas destinados para este fin (Subía & Rubio, 2018).

Los componentes lipídicos que poseen las microalgas sirven de base para diferentes usos de biorremediación y bioenergéticos como el bioetanol, biogás, biodiesel y biohidrógeno. Así mismo los triglicéridos (TAG), sirven como reserva de energía en las algas; por medio de transesterificación estos lípidos pueden ser convertidos en biodiesel con facilidad, cambiando el glicerol por alcohol y obteniendo glicerol y éster-metílico del cual se obtiene biodiésel (Yerovi, 2020).

Las condiciones generales para un cultivo óptimo de microalgas incluyen medios ambientales propicios como; factores abióticos (intensidad de la luz fotosintética y mixotrófica, carbono, salinidad, O₂, temperatura, pH, CO₂, macronutrientes (nitrógeno, fósforo, magnesio y silicatos), micronutrientes -dependiendo de la especie utilizada- y toxinas), factores bióticos (hongos, bacterias y virus); así mismo es fundamental tomar en cuenta factores operativos (tanque de cultivo, frecuencia de cosecha, mezcla, agitación, dimensiones del tanque) para obtener un cultivo exitoso (Escobedo & Calderón, 2021; Bux & Chisti, 2016).

Otro elemento determinante en el crecimiento de biomasa microalgal, es el medio donde se desenvuelve, existen medios químicos como Bold's Basal Medium (BBM) que es un medio de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

cultivo para algas de agua dulce que no precisa de ocupar extractos de suelos o vitaminas. Otro medio de cultivo prometedor pueden ser las aguas residuales, ya que contienen gran cantidad de nutrientes dependiendo su fuente y se evita el uso de la tierra, lo que contribuye al cambio climático y existe una simbiosis biocombustibles – biorremediación (Lackner, 2021).

Las aguas residuales son todos los tipos de agua afectada negativamente, resultado de actividades humanas, que pueden ser domiciliarias, ganaderas, industriales, entre otras. Aproximadamente el 80% de aguas residuales se reintegran al ecosistema convirtiéndose en uno de los grandes desafíos del agua, ya que no son tratadas ni reutilizadas debido a su calidad y condiciones. Estas aguas dependiendo de su fuente de procedencia, pueden contener; grasas, materia orgánica, detergentes, plaguicidas, sustancias tóxicas y residuos ganaderos o de la industria (UNESCO, 2017).

La tecnología de tratamientos de aguas residuales aplicando únicamente consorcios de microalgas ha demostrado ser efectiva en la remoción de nutrientes; un consorcio de microalgas es una asociación de dos o más microorganismos; por ejemplo, dos especies de microalgas diferentes o microalgas eucariotas y cianobacterias procariotas, que son capaces de llevar a cabo la fotosíntesis y que para su óptimo desarrollo requieren de luz y compuestos inorgánicos que poseen nitrógeno y fósforo (Lobos, 2019).

Actualmente el uso de consorcios o asociación de microalgas o microalgas-bacterias son una solución biológica prometedora frente a la necesidad de implementar tecnologías innovadoras, rentables y eficaces enfocados en la remoción de nutrientes (nitrógeno y fósforo) de las aguas residuales con el fin de aumentar la calidad del efluente descargado a los cuerpos de agua naturales (Lobos, 2019).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

El agua residual obtenida durante el faenamiento porcino posee varias cantidades de nutrientes, entre ellos están compuestos orgánicos e inorgánicos como distintas formas de nitrógeno, fósforo y carbono, los cuales son de gran provecho para el crecimiento de microalgas, basado en estas propiedades se considera el uso de esta agua residual como una alternativa de medio de cultivo para producción de biomasa microalgal (Herrera, 2021).

El consumo de carne (vacuno, cerdo, pollo, entre otros) superó sin duda alguna en el 2021 en más del doble registrado en 1990, poniendo a la carne procedente de las aves en primer lugar aumentando en este periodo de 34,6 toneladas en 1990 a cerca de 132,5 millones de toneladas en 2021, y poniendo en segundo lugar al consumo de carne proveniente de cerdo (Orus, 2022).

En estadísticas sobre el volumen de carne porcina producida en el mundo en un periodo de 10 años, 2012 a 2022 se estima que en 2021 el volumen de carne de cerdo producida estuvo alrededor de 107,7 millones de toneladas, mientras que en el 2022 se considera que superó los 110 millones (Orus, 2022).

Dentro de Ecuador, PRONACA es una de las grandes cadenas que genera e innova en líneas de consumo porcino para las familias ecuatorianas, en el año 2022, ha ido incorporando nuevas líneas de productos Mr. Chanco, ya que, según su gerente comercial de la línea de cerdos María Eliza Valenzuela, tras la pandemia el consumo de carne de cerdo en Ecuador aumentó potencialmente; esto significa que al existir mayor demanda de consumo de carne porcino el faenamiento de estos animales aumenta y la existencia de aguas residuales obtenidas durante el faenamiento porcino también aumenta su volumen (El Productor, 2022).

Como reflejo de estos datos, por la demanda de producto cárnico porcino y generación de aguas residuales de faenamiento por su consumo, es importante seguir innovando y poder implementar

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

nuevas tecnologías rentables que funcionen como sinergia entre la biorremediación para las aguas residuales y el uso de las mismas como un medio de cultivo para la obtención de biomasa microalgal que representa una opción como fuente de energía sostenible.

El uso de agua residual de faenamiento porcino representa una alternativa prometedora como medio de cultivo para las microalgas, dado que no usa fuentes naturales de aguas, reducen las concentraciones de demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), patógenos, carga contaminante de las aguas residuales, metales pesados, son capaces de disminuir la contaminación de aire por ser esenciales para el ciclo del carbono y sintetizan proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos, moléculas necesarias para la obtención de biocombustibles (Herrera, 2021).

En esta investigación se determinó el rendimiento lipídico a partir de biomasa de un consorcio microalgal, *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* identificadas por primera vez por Meyen en 1829 y Beijerinck en 1890 respectivamente; cultivadas en agua residual de faenamiento porcino haciendo uso de biorreactores frente a las condiciones atmosféricas de Quito.

2. HIPÓTESIS

El agua residual de faenamiento porcino es capaz de aportar los nutrientes necesarios para que el consorcio de microalgas (*Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*) crezca adecuadamente, alcanzando un porcentaje de lípidos superior al 20% y de ácidos grasos libres superior al 80%, de modo que sus ésteres metílicos de ácidos grasos puedan emplearse en la producción de biodiésel a partir de la transesterificación de biomasa microalgal.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

3. OBJETIVOS

3.1. General.

Determinar el rendimiento de lípidos a partir de biomasa de un consorcio de microalgas cultivado en agua residual de faenamiento porcino.

3.2. Específicos.

- Caracterizar el agua residual de faenamiento porcino mediante análisis fisicoquímicos para la verificación de un contenido de nutrientes mínimos para el crecimiento de microalgas.
- Analizar el crecimiento del consorcio de microalgas de estudio en un fotobiorreactor para la producción de biomasa con fines de extracción de lípidos.
- Caracterizar el agua residual postcosecha mediante análisis fisicoquímicos para la comprobación de remoción de nutrientes.
- Determinar la fracción lipídica de la biomasa cultivada mediante procesos de extracción de lípidos totales, ácidos grasos libres y ésteres metílicos, para la comprobación de su potencial en la producción de biodiésel.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

4.1.1 General

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

El estudio se realizó dentro de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la Universidad Internacional SEK, dentro del laboratorio de Química, ubicado en la ciudad de Quito, región sierra del Ecuador.

4.1.2 Específica

Avenida Alberto Einstein y Quinta Transversal. Carcelén, Quito – Ecuador.

4.2 Recolección del Agua Residual

La ciudadela La Ecuatoriana, pertenece a la parroquia de Chillogallo la cual corresponde a una parroquia urbana de la ciudad de Quito en la provincia de Pichincha – Ecuador, ubicada al sur de la urbe constituyendo una de las más grandes y pobladas de Quito. Se caracteriza por mantener un clima frío – templado y grandes montañas hacia su extremo occidental, por lo general mantiene una temperatura máxima de 16.2°C en el mes más cálido (septiembre), y de 5.2°C en el mes más frío (julio). Este fue el sector donde se llevó a cabo la recolección del agua residual de faenamiento porcino, ya que aquí se encuentra ubicada la Empresa Municipal de Rastro – Quito. Dentro de esta empresa se realiza el faenamiento y comercialización de especies animales (bovinos, ovinos y porcinos) para el consumo humano en el Distrito Metropolitano de Quito.

4.3 Materiales

- Inóculo de microalgas (*Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*).
- Agua residual de faenamiento porcino.
- Reactivos y equipos.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

4.4 Metodología

4.4.1 Fase de Campo

- **Recolección de medio de cultivo**

Dentro de la Empresa Pública Metropolitana de Rastro – Quito se recolectaron 60 litros de agua residual de faenamiento porcino en el tamiz (rejilla) curvo de barra auto limpiante (Figura 1) , el cual es el primer paso del sistema de tratamiento de aguas residuales dentro de la empresa en donde baja el agua residual de faenamiento animal en este caso porcino y este tamiz permite retener cualquier objeto grande o extraño presente en el caudal, evitando dañar las bombas de transferencia sumergibles de los tanques de homogenización que es el siguiente paso del proceso de tratamiento. Con ayuda de un balde se recolectó el agua residual que baja con todos los nutrientes que la misma contiene, ya que sale con residuos grandes, se usó una tela coladora para que se mantenga el agua y sus nutrientes con la menor cantidad de sólidos suspendidos. El agua de faenamiento porcino se colocó en tres canecas plásticas cada una con una capacidad de 20 litros, fueron selladas con papel film, etiquetadas y almacenadas a una temperatura de 4°C.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO



Figura 1. Tamiz curvo de barra auto limpiante.

- **Obtención del inóculo**

Las cepas en consorcio utilizadas en el presente estudio son *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp., obtenidas del Banco Español de Algas, las cuales fueron conservadas en el Laboratorio de Química dentro de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la Universidad Internacional SEK, en la ciudad de Quito – Ecuador. Para la cinética de crecimiento celular se empleó medio BBM (Bold's Basal Medium) el cual es óptimo y asegura el crecimiento y subsistencia de microalgas verdes de agua dulce, como las que se emplean en el estudio. Durante toda la fase experimental el medio BBM contenía seis soluciones de stock, cada una contenía una de las siguientes sales en la concentración señalada (Tabla 1) (Nichols & Bold, 1965). Adicional a las soluciones stock, se usaron 4 soluciones de oligoelementos en stock, preparadas con las siguientes concentraciones (Tabla 2) (Nichols & Bold, 1965):

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Tabla 1. Preparación medio BBM. Sales empleadas en seis soluciones stock de 400mL de volumen cada una.

Sales	Concentración (g*mL)
NaNO ₃	10.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.0
K ₂ HPO ₄	3.0
KH ₂ PO ₄	7.0
NaCl	1.0

Tabla 2. Preparación medio BBM. Preparación de soluciones de oligoelementos en stock.

Soluciones de oligoelementos	Preparación
1	50 g EDTA y 31 g KOH disueltos en 1 litro de H ₂ O
2	4.98 g FeSO ₄ .7H ₂ O disueltos en 1 litro de H ₂ O acidificado
3	11.42 g H ₃ BO ₃ disueltos en 1 litro de H ₂ O
4	Todos a continuación disueltos en 1 litro de H ₂ O: ZnSO ₄ .7H ₂ O, 8.82 g; MnCl ₂ .4H ₂ O, 1.44 g; MoO ₃ , 0,71 g; CuSO ₄ .5H ₂ O, 1,57 g; Co (NO ₃).6H ₂ O, 0.49 g.

Cada uno de los elementos descritos fueron diluidos en agua destilada de acuerdo con los stocks establecidos por Nichols & Bold (1965), autoclavados y enfriados previo a su uso con el consorcio microalgal.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

4.4.2 Fase de Laboratorio

- **Caracterización del agua residual de faenamiento porcino y determinación de parámetros fisicoquímicos (NT, CT, PT)**

La caracterización fisicoquímica del agua residual de faenamiento porcino se realizó con la toma de una muestra de 4 litros del agua obtenida en la Empresa Pública Metropolitana de Rastro – Quito. Los métodos estandarizados para la caracterización se muestran en el Anexo 1.

La determinación de Nitrógeno Total (NT), Carbono Orgánico Total (COT) y Fósforo Total (PT) se realizó centrifugando la muestra de agua residual en tubos Falcon de 50 mL dentro de la centrifugadora (Boeco C-28A) por 5 minutos a 4000 rpm, el sobrenadante obtenido se recolectó para realizar por triplicado el análisis y determinación de los parámetros fisicoquímicos del cultivo empleando la metodología estandarizada de los métodos utilizados que se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados para la determinación de macronutrientes.

Macronutriente / Parámetro Fisicoquímico	Método
Nitrógeno Total por digestión con persulfato	10072 fijado por HACH (2015)
Fósforo Total por digestión con molibdeno y ácido persulfato	10127 propuesto en HACH (2014b)
Carbono Total para la determinación de concentración de carbono orgánico	10128 según HACH (2014a)

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

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Se autoclavarón 45 litros de agua residual de faenamiento porcino (Empresa Pública Metropolitana de Rastro – Quito) en pírex de 5 galones de capacidad, fueron autoclavadas a una presión de 121°C y 15 psi durante 1 hora para su esterilización, se dejó enfriar el agua autoclavada durante 24 horas a temperatura ambiente; pasado este tiempo con la ayuda de un filtro multicapa (diámetro de poro de 0.6 a 1.6mm) y un filtro convencional de plástico se filtró el medio de cultivo con el fin de retener todos los sólidos suspendidos que hayan podido quedar en el agua de faenamiento porcino.

Los inóculos se conservaron en: a) tres botellas de vidrio autoclavables de 1000 mL(mini biorreactores), con 800 mL de medio BBM (Tabla 1 y Tabla 2) y consorcio microalgal (*Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*), b) cuatro botellas de vidrio autoclavables de 1000 mL(mini biorreactores), con 800 mL de agua residual de faenamiento porcino y consorcio microalgal (*Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*); por 7 días, respectivamente hasta alcanzar una concentración celular idónea ($\sim 10^6$ cel/mL). Los reactores mantuvieron conexiones de aireación continua con filtros de entrada y salida de aire (poro de 0,45um), a temperatura ambiente, con fotoperiodos de 12 horas y con luz artificial constante a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, como lo menciona Chia et al., (2013) durante siete días previo a la siembra directa en el fotobiorreactor (Figura 2).



OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Figura 2. Reactores mantenidos a conexiones de aireación continua con filtros de entrada y salida de aire (poro de 0,45µm), a temperatura ambiente, con fotoperiodos de 12 horas y con luz artificial constante a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Siembra del inóculo en el fotobiorreactor

Se utilizó un fotobiorreactor de tipo cerrado de vidrio (71.3 cm de largo x 8.8 cm de ancho x 61 cm de alto) (Figura 3), ya que el espacio que se ocupa con este sistema es menor y dadas las condiciones ambientales donde está situado se buscó evitar contaminaciones e infecciones bacterianas o virales del cultivo que ocasionen la muerte o disminución de la población microalgal (Estevez, 2021). El fotobiorreactor se encontró adaptado a una termocupla y articulado con mangueras de aireación continua, conectadas a un compresor encargado de mantener un burbujeo constante para su aireación. Los 45 litros de agua residual de faenamiento porcino previamente esterilizada y filtrada se colocaron dentro del biorreactor, a la cual se inoculó con los 5 litros de cultivo de consorcio microalgal conservados en los mini biorreactores de conservación. Se estableció una proporción 1:10 entre el medio de cultivo y la cepa microalgal en el fotobiorreactor, expuesto a la intemperie y con las condiciones atmosféricas de la ciudad de Quito durante el mes de junio del 2022, con un flujo de aireación continua de 4.2 L/min, un pH constante de 6.77 ± 0.34 y un control de temperatura $28 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a lo largo de 13 días.



OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Figura 3. Fotobiorreactor tipo cerrado de vidrio (71.3 cm de largo x 8.8 cm de ancho x 61 cm de alto). Flujo de aireación continua de 4.2 L/min, pH constante de 6.77 ± 0.34 y control de temperatura 28 ± 2 °C.

- **Determinación del crecimiento celular**

Diariamente durante un periodo de 13 días se recolectaron 50 mL de muestra del fotobiorreactor en botellas de plástico recicladas, previamente lavadas y desinfectadas bajo luz UV; posteriormente para estacionar y minimizar el crecimiento celular se llevaron las muestras a un refrigerador que permanecía 4°C durante 24 horas. Para determinar el crecimiento de los cultivos se realizaron cuatro metodologías: densidad óptica, conteo celular, peso seco y productividad total.

- **Densidad Óptica**

La densidad óptica se usó para medir diariamente el crecimiento celular microalgal, se realizó mediante espectrofotometría con medición de absorbancia en un espectrofotómetro (marca HACH 5000) calibrado a una longitud de onda de 680 nm. Se colocó en una celda de vidrio 1 mL de la muestra recolectada durante los 13 días respectivamente, se midió y registró los datos diarios por triplicado, el blanco que se usó fue el agua residual de faenamiento porcino sin el inóculo microalgal.

- **Conteo Celular**

El conteo celular de forma directa se realizó utilizando la cámara de Neubauer en un microscopio óptico (marca LEICA a 40X), siguiendo el protocolo determinado por Batidas (2011). Este proceso se realiza enumerando cada uno de los cuadrantes visualizados y contando el número de células presentes en cada uno de los mismos en forma de zigzag (Subía & Rubio, 2018). En la Figura 4 se observa el consorcio microalgal en el medio de cultivo de faenamiento porcino a 40X.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

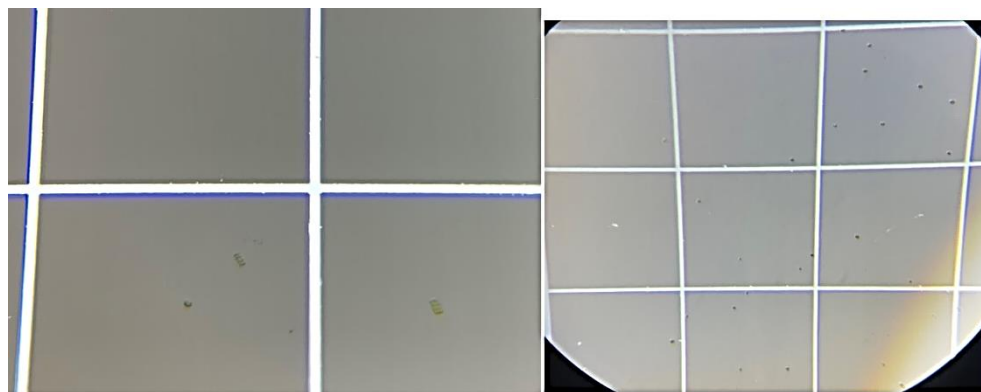


Figura 4. Consorcio microalgal en medio de cultivo de faenamiento porcino a 40X.

Para lograr realizar el conteo de cada celda y dependiendo de la concentración diaria que tenían las muestras se realizaron sus respectivas diluciones con agua destilada, si tenían gran concentración que por lo general fue en los días intermedios se realizó una dilución 1:100 a diferencia de los días que no se obtuvo tanta concentración, la dilución fue 1:10. Se realizó el conteo y registro de datos por duplicado calculando su respectiva concentración celular aplicando la Ecuación (1).

$$\text{Concentración Celular} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número de células} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) \cdot 10.000}{\text{número de cuadros}} \cdot \text{dilución} \quad (1)$$

○ **Peso seco**

La concentración de biomasa microalgal por gravimetría se determinó mediante el proceso de peso seco siguiendo el protocolo de Gaspar (2019), usando papel filtro, biomasa húmeda y un vidrio reloj. Se usó papel filtro de 125mm de diámetro el cual se dejó secar en una estufa a 60°C por 24 horas, pasado este tiempo se colocó el papel filtro en un desecador durante 20 minutos para que se enfríe a temperatura ambiente, pasado este tiempo se pesó el papel filtro al vacío con ayuda

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

de una balanza analítica. El proceso se realizó por triplicado y fijándose en obtener valores constantes al momento de pesar. Posterior a obtener los respectivos valores se colocó en el papel 1 mL de las muestras por día y se dejó nuevamente en la estufa marca *WiseVen Scientific* durante 24 horas a 60°C. Pasadas las 24 horas se pesó el filtro seco con la muestra de microalgas y se aplicó la Ecuación (2) para obtener los respectivos resultados.

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

○ **Productividad Total**

Se determinó la productividad total obtenida de la biomasa de consorcio microalgal mediante la Ecuación (3), en donde la biomasa total representa a la suma de biomasa seca y húmeda obtenidas durante los 13 días respectivamente, su volumen y el tiempo total del cultivo (Herrera, 2021).

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

• **Obtención de biomasa microalgal**

Transcurridos 13 días se comprobó mediante conteo celular que se alcanzó la fase estacionaria del cultivo e iniciaba la muerte celular del mismo, por lo cual se vació el fotobiorreactor colocando el agua residual con su inóculo de consorcio microalgal en siete pírex de 5 litros esterilizados; 2 litros de sobrenadante se guardaron para próximos análisis en laboratorios externos y el resto de sobrenadante se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm en tubos Falcon de 50 mL con un

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

volumen de 40 mL para lograr recuperar y concentrar la mayor cantidad de biomasa. Al tener toda la biomasa recolectada se dividieron en dos partes, una parte se dejó secar en varias placas Petri a 100°C dentro de una estufa para obtener biomasa seca y la otra parte se separó como biomasa húmeda refrigerada a -4°C.

- **Caracterización del agua residual postcosecha**

Luego de finalizar el cultivo en el fotobiorreactor se realizó la centrifugación de las muestras y el sobrenadante se almacenó para su caracterización fisicoquímica; para esto se guardaron 4 litros del sobrenadante obtenido al terminar el tiempo de cultivo en el fotobiorreactor. Los métodos estandarizados para la caracterización son expresados en el Anexo 1.

La determinación de porcentajes y concentraciones de remoción para Nitrógeno Total (NT), Carbono Orgánico Total (COT) y Fósforo Total (PT) se realizó de manera análoga a la caracterización del agua residual previo al cultivo. Para ello se centrifugó el sobrenadante del cultivo y se siguieron los métodos de análisis reportados en la Tabla 3. Otros análisis de metales como cobre, molibdeno, calcio, hierro, etc., se analizaron en un laboratorio externo certificado para análisis de aguas. El cálculo del porcentaje de remoción de nutrientes se realizó con la Ecuación (4) establecida por Eladel (2019), la cual determina el grado de sustracción de un nutriente en específico del agua residual. Donde C_I y C_F son las concentraciones iniciales y finales del nutriente, respectivamente.

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

- **Extracción de lípidos totales**

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Se realizó la extracción de lípidos totales presentes en biomasa seca y húmeda preservada anticipadamente, con seis solventes orgánicos seleccionados en base a revisión bibliográfica (Guasumba, 2022; Herrera, 2021; Sánchez-Bayo et al., 2020): hexano, metanol, cloroformo:metanol (1:2), etanol, acetato de etilo y metilciclohexano; siguiendo el protocolo establecido por Hadrach (2018), Salazar (2012) y Bligh & Dyer (1959); adicional a esto se realizaron ciertas modificaciones incluyendo el lavado con NaCl al 0,58%, señaladas por Kumar (2015) con el fin de aumentar la pureza de las muestras y centrifugando varias veces a 4000 rpm para homogenizar la extracción de las mismas siguiendo las recomendaciones de Aguilar *et al.*, (2011). Se realizó sonicación para poder romper la pared y membrana del consorcio microalgal, para el procedimiento se ocupó un aproximado de 17 g de biomasa húmeda y 12 g de biomasa seca, considerando que la extracción con cada solvente se realizó por triplicado.

El porcentaje total de lípidos para cada solvente extractor por gravimetría se calculó con la Ecuación (5) señalada por Hadrach (2018) y Zhu (2016).

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

Donde:

- P_L = Peso del frasco con el contenido lipídico extraído y seco en gramos
- P_B = Peso de la biomasa microalgal húmeda o seca en gramos
- % = Representado en %m/m

La productividad total volumétrica de lípidos se calcula mediante la Ecuación (6), descrita por Guasumba (2022).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

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

Donde:

- M_L = Masa de los lípidos
- V = Volumen del cultivo en litros
- t = Tiempo en días

La productividad específica de biomasa se determinó mediante la Ecuación (7), en base a revisión bibliográfica (Vega, 2022).

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

Donde:

- Productividad volumétrica de biomasa se encuentra expresada en g/L.d
- Concentración de biomasa obtenida expresada en g/L

• Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL)

Se realizó la extracción de AGL presentes en la biomasa seca, aplicando la saponificación de biomasa con solventes orgánicos (hexano, metanol, cloroformo:metanol (1:2), etanol, acetato de etilo y metilciclohexano) y catalizador básico (KOH), guiado mediante el protocolo de extracción de AGL de Dejoye et al., (2013) y realizando ciertas modificaciones junto al protocolo de Toumi (2022). Se ocuparon 0,5 g de biomasa seca de consorcio microalgal, se realizó cada muestra con saponificación de biomasa usando 20 mL de metanol y 0.1 g de KOH. Se preparó un equipo de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

reflujo constante (Figura 5) en el cual estuvo la muestra por 4 horas a 60°C y 300 rpm en un baño térmico.



Figura 5. Equipo de reflujo constante para la extracción de ácidos grasos libres (AGL).

Para el proceso de purificación con una bomba al vacío se filtró la muestra y se ajustó su pH con HCl 1 M; para la separación de dos fases, orgánica e inorgánica, se ocupó un embudo de decantación en la cual quedaban ácidos grasos (orgánica) y residuos no lipídicos (inorgánica). El procedimiento se realizó por triplicado; se usó la Ecuación (8) referida por Guasumba (2022) para determinar su porcentaje lipídico de ácidos grasos por gravimetría.

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

Donde:

- T_1 = Peso del frasco recolector vacío en g
- T_2 = Peso del frasco recolector con ácidos grasos libres en g
- W = Peso inicial de biomasa utilizada para el procedimiento de extracción en g

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

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

La extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME por sus siglas en inglés) presentes en la biomasa seca, las grasas obtenidas en la extracción de lípidos y AGL, se realizó y obtuvo en tres procesos:

- Proceso Directo: Biomasa Microalgal seca con catalizadores.
- Proceso Indirecto: Grasa de extracciones en seco y húmedo con catalizadores.
- Proceso con AGL: Grasa de extracciones de AGL con catalizadores

Usando para los cada uno de ellos catalizadores ácidos, homogéneos siendo este ácido sulfúrico (H_2SO_4) y heterogéneos usando para este la resina comercial CT-269.

Se inició con el procedimiento de FAME directa seguido de FAME a partir de AGL y finalmente indirecta en seco y húmedo; los procedimientos se realizaron por triplicado. El protocolo usado se estableció acorde a lo mencionado por Sánchez – Bayo (2020) y Belkhanchi (2021), usando un set de tubos de vidrio en su interior se encontraban el catalizador, solvente y biomasa respectiva para cada proceso, con imanes agitadores sumergidos en un baño térmico a 400 rpm, manteniendo una temperatura de 90°C durante 4 horas.

Pasadas las horas se dejó enfriar por unos minutos y se lavó la muestra con 5 mL de agua desionizada mili Q, se filtró la muestra en un filtro al vacío para retener las impurezas y restos de catalizador que pudieron quedar, posteriormente dentro de un embudo de decantación para realizar la purificación al filtrado se le agregaron 2 mL de una mezcla hexano: dietiléter (80:20) esperando de 5 a 8 minutos para observar la separación de fases (Figura 6) con una pipeta Pasteur y el embudo de decantación se extrajo la fase de interés, es decir, la fase orgánica la cual contenía los esteres

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

metílicos de ácidos grasos. Para cuantificar el porcentaje de FAME por gravimetría se dejaron secar los tubos que contenían la fase orgánica en una estufa a 90°C durante 24 horas, se pesaron y se aplicó la Ecuación (9) (Herrera, 2021; Guasumba, 2022) en donde se determinó el resultado del porcentaje de FAME por diferencia de pesos en gramos de cada frasco respectivamente a cada proceso. Todos los porcentajes son representados en %m/m.

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

Donde:

- T_1 = Peso del frasco recolector vacío en g
- T_2 = Peso del frasco recolector con los FAME extraídos en g
- W = Peso inicial de biomasa utilizada para el procedimiento de extracción en g



Figura 6. Separación de fases orgánico e inorgánico en embudo de destilación.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

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

Como un procedimiento cualitativo se realizó una comprobación mediante TLC, por triplicado, usando una placa de gel de sílice marca ALUGRAM Xtra Sil de 40*80 mm y 0.2 mm de sílica del. La placa se colocó sobre un papel absorbente teniendo mucho cuidado de no tocar su base, a 1 cm de la base se trazó una línea (sin manipular bruscamente la placa) con ayuda de un lápiz sobre la cual estuvieron marcados los tres puntos de control y ubicación para las muestras usadas (control, lípidos de AGL, lípidos de FAME). Posterior a tener la placa señalada, se metió a la estufa para su activación durante 30 minutos a 100°C; pasado el tiempo se colocaron las muestras disueltas con 3 ul de su propio solvente extractor (cloroformo:metanol 1:2) y con ayuda de un tubo capilar de 1.4 mm de diámetro se asentó en la placa cada muestra en su respectiva marca base. El estándar utilizado fue oleato de colesterol marca SIGMA suspendido con 1mL de cloroformo por cada 100 mg del estándar (Vega, 2022). Se dejó reposar la placa sobre la fase móvil de cloroformo:metanol (1:2) en un frasco sellado por aproximadamente de 10 a 15 minutos, pasado el tiempo se usó una cámara de yodo y sílica gel para a través de sus vapores revelar la corrida de la placa, lo cual demoró de 10 a 12 minutos más, paralelamente al protocolo de Cabrera (2016) y en base a bibliografía de Vega (2022). El procedimiento de TLC se realizó con el mejor solvente extractor de AGL y FAME. Para calcular el factor de retención (R_f) se usó la ecuación (10) señalada por Rodríguez (2008) la cual relaciona las distancias en cm recorridas por la muestra y la fase móvil.

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

4.4.3 Fase de Análisis Estadísticos

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Todos los valores obtenidos en los procesos de crecimiento celular para consorcio microalgal (densidad óptica, conteo celular y peso seco), parámetros fisicoquímicos en remoción de nutrientes (NT, PT, COT) y metales en el medio se realizaron por triplicado de muestras técnicas y se expresan con valores de desviación estándar ($X \pm DE$); por medio de la prueba Kruskal Wallis se realizó la comparación de medias en los diferentes parámetros, determinando así que las diferencias entre medias significativas se generan cuando el valor p sea mayor a 0.05 ($p > 0,05$) (Herrera, 2021).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización del agua residual de faenamiento porcino mediante análisis de parámetros fisicoquímicos

Tomando en cuenta de que en este estudio no se realizaría reposición de nutrientes durante el tiempo de cultivo, se comprobó la existencia mínima de nutrientes del agua residual de faenamiento porcino y se comparó con los nutrientes que aporta un medio idóneo para el crecimiento de microalgas como el medio BBM. Los resultados se muestran en la tabla 4, en la cual se observa que, aunque presenta menor concentración de los nutrientes expresados en forma de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT), existen nutrientes que podrán ser aprovechados por las microalgas una vez se siembren en el fotobiorreactor.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Tabla 4. Caracterización del agua residual de faenamiento porcino vs medio líquido BBM

Parámetros Fisicoquímicos	Agua residual de faenamiento porcino	Medio de cultivo Bold Basal Medium (BBM)
Nitrógeno total (mg/L N)	49	262
Fósforo total (mg/L PO ₄ ⁻³)	18,45	127.8
Carbono orgánico total (mg/L C)	80,2	4
pH	7	7

5.2 Determinación del Crecimiento Celular

5.2.1 Densidad Óptica

En la Figura 7 se puede observar el comportamiento que tuvo el consorcio microalgal conformado por las especies de estudio al momento de ser cultivado en el agua residual de faenamiento porcino y a lo largo del periodo que estuvo en el fotobiorreactor, que en este caso fueron 13 días. El crecimiento medido por densidad óptica mostró el crecimiento que tuvo el consorcio microalgal, iniciando con una densidad óptica de $0,335 \pm 0,011$ apenas fue inoculada con en el medio de cultivo, mantuvo un crecimiento exponencial siendo los días 5 y 6 los más altos y su pico máximo el día 6, siendo este el día de mayor densidad óptica, donde se observa un incremento notorio de absorción desde el día 1 al día 6 respectivamente con valores de $0,347 \pm 0,020$ a $0,407 \pm 0,006$. A partir del día 7 se observa un decrecimiento en los valores de absorción pasando de $0,372 \pm 0,0005$ el día 7 y $0,32 \pm 0,002$ el día 12, finalmente el último día, siendo este el día 13 se reportaron valores de absorción de $0,318 \pm 0,001$. En la figura 7 se incluyen los datos

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

de crecimiento celular de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* obtenidas por Herrera (2021) para comparación y discusión con los resultados del consorcio.

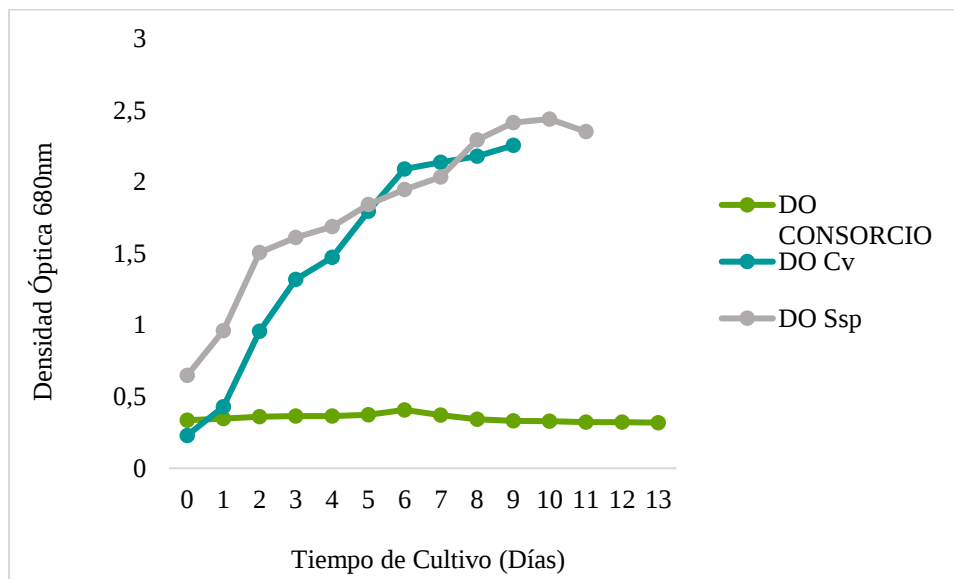


Figura 7. Densidad óptica de consorcio microalgal, *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta la densidad óptica a 680nm y en el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días de consorcio microalgal. Cv: *Chlorella vulgaris*, Ssp: *Scenedesmus* sp.

5.2.2 Conteo Celular

Los resultados registrados durante los 13 días de cultivo de acuerdo al número de células obtenidas diariamente se observan en la Figura 8, aquí se puede ver la curva de crecimiento del consorcio microalgal. El día 0 es decir día de cultivo en el consorcio microalgal se obtuvieron valores de $1,68 \cdot 10^6 \pm 6,63 \cdot 10^1$ cel/mL expresando una fase de latencia. Del día 1 al día 5 se expresa la fase exponencial y se observó una concentración celular de $1,88 \cdot 10^5 \pm 1,44 \cdot 10^4$ a $3,73 \cdot 10^5 \pm 1,55 \cdot 10^4$ cel/mL, respectivamente. La fase estacionaria de la curva se registra en los días 6 y 7 con valores de $3,78 \cdot 10^6 \pm 1,77 \cdot 10^5$ hasta $3,15 \cdot 10^6 \pm 3,43 \cdot 10^5$ cel/mL, respectivamente.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Finalmente, se registró del día 8 al 13 un decrecimiento en la curva y la fase de muerte celular se expresó los días 10 al 13 disminuyendo la concentración celular de $2,54 \times 10^5 \pm 3,20 \times 10^4$ a $1,98 \times 10^5 \pm 1,66 \times 10^4$ cel/mL. En la figura 8 se incluyen los datos de crecimiento celular de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* obtenidas por Herrera (2021) para comparación y discusión con los resultados del consorcio.

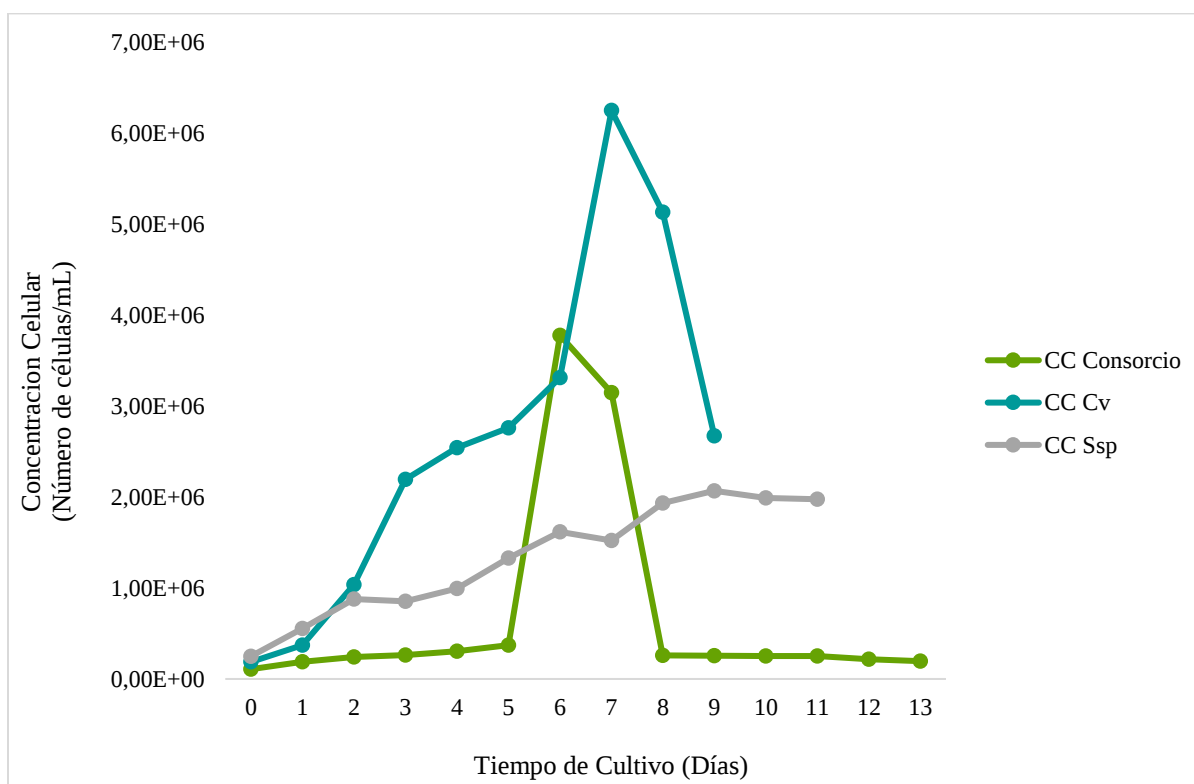


Figura 8. Conteo celular de consorcio microalgal, *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta la concentración celular en cel/mL y en el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días. Cv: *Chlorella vulgaris*, Ssp: *Scenedesmus* sp.

5.2.3 Peso Seco

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Los resultados obtenidos en el peso seco del consorcio microalgal se expresan en la Figura 9, iniciando el día 0 con $0,0033 \pm 0,0025$ g/L, del día 1 al día 5 se observa un crecimiento con valores de $0,0037 \pm 0,0008$ g/L hasta $0,0055 \pm 0,0014$ g/L respectivamente, llega a su pico máximo con una concentración de $0,0062 \pm 0,0007$ g/L demostrando un aumento significativo el día 6; finalmente se observa un decrecimiento lineal desde el día 7 al día 12, hasta que llega al día 13 terminando con una concentración de $0,005 \pm 0,0005$ g/L. Al igual que en parámetros anteriores, en la figura 9 se incluyen los datos de crecimiento celular de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* obtenidas por Herrera (2021) para comparación y discusión con los resultados del consorcio.

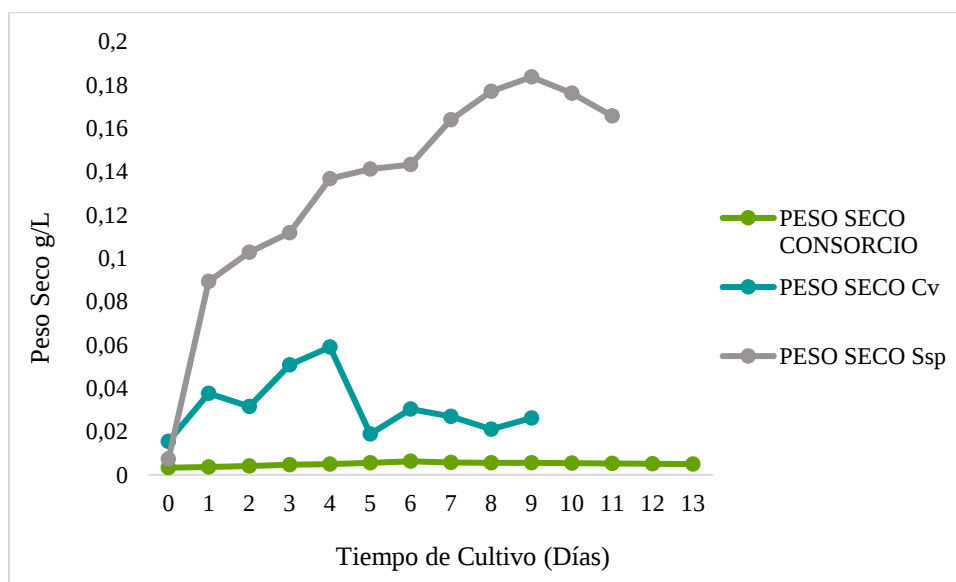


Figura 9. Peso seco de consorcio microalgal, *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta la cantidad de biomasa microalgal en g/L y en el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días. Cv: *Chlorella vulgaris*, Ssp: *Scenedesmus* sp.

5.2.4 Productividad Total

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Tabla 5. Generación de biomasa y productividad obtenida del consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino.

Medio de Cultivo	Agua residual de faenamiento porcino
Especie	Consortio Microalgal (<i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella vulgaris</i>)
Biomasa (g)	26,84 g
Volumen (v)	50 L
Tiempo (d)	13 días
Biomasa Total (g/L)	0,537 (g/L)
Productividad Volumétrica (g/L/d)	0,0413 (g/L/d)
Productividad Específica (d⁻¹)	0,0769 d ⁻¹
Tasa de Crecimiento Específica (d⁻¹)	0,6886 d ⁻¹
Tiempo de Duplicación (d)	1,0065

5.3 Caracterización del agua residual postcosecha para la verificación de remoción de nutrientes

Para la verificación de los resultados obtenidos en los análisis de remoción de nutrientes sobre nitrógeno, fósforo y carbono orgánico totales, se representan en la Figura 10. En esta figura se muestra el porcentaje de remoción de nutrientes que se generó durante los 13 días de cultivo en el agua residual de faenamiento porcino.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

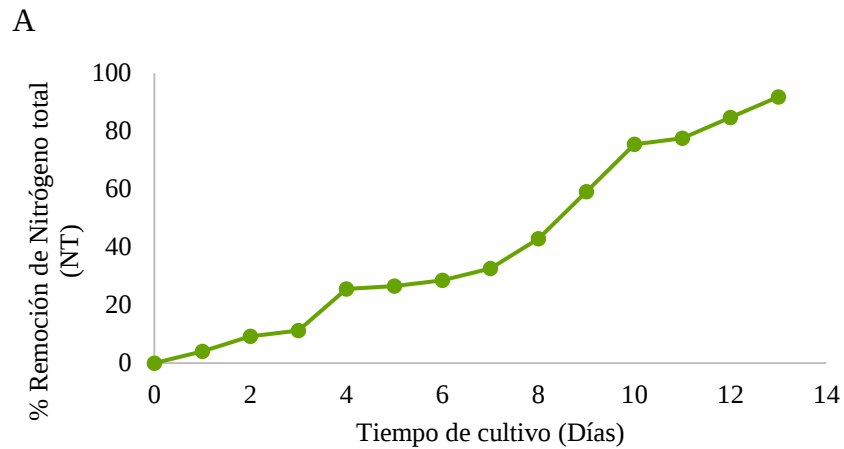


Figura 10A. Porcentaje de remoción de nitrógeno total en consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta % de remoción y en el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días.

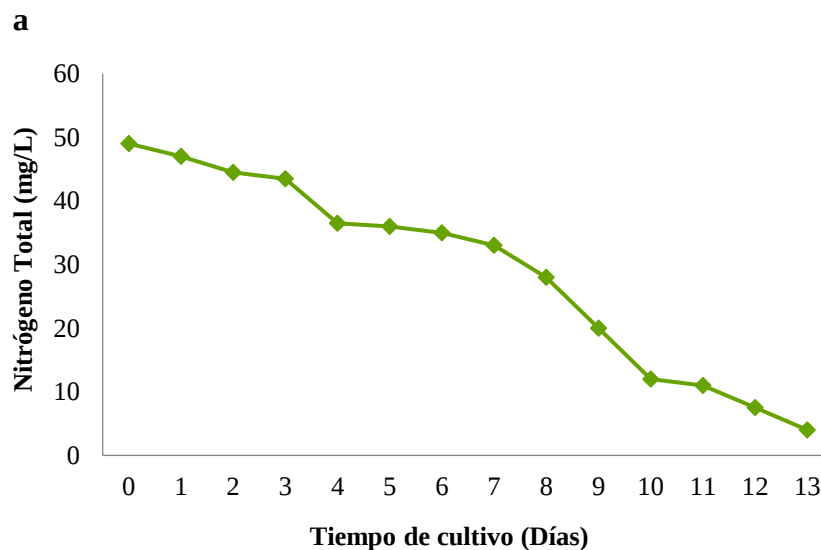


Figura 10a. Concentración de nitrógeno en consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta concentración de nitrógeno en (mg/L) y en el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

En la Figura 10a, se observa que el día 0 fue el día con mayor concentración de nitrógeno en el medio de faenamiento porcino con un valor de $49 \pm 1,414$ mg/L, su remoción de nitrógeno total como se observa en la Figura 10A es de 0%; al paso de los días se observa un crecimiento en el porcentaje de remoción de nutrientes, el día 4 con 25,51%, el día 8 con 42,85% y el día 10 con 75,51%; finalmente día 13 se obtuvo una concentración de nitrógeno de $4 \pm 2,82$ mg/L y un porcentaje de remoción total de nitrógeno de 91,83%.

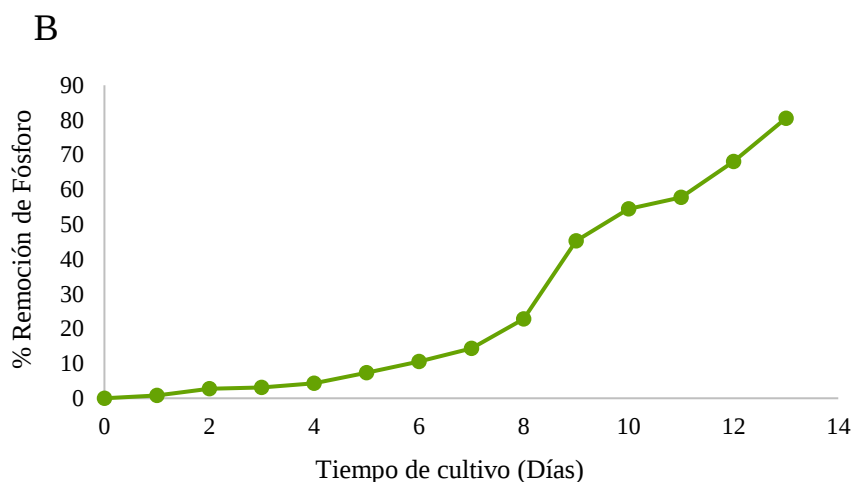


Figura 10B. Porcentaje de remoción de fósforo total en consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta % de remoción y en el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

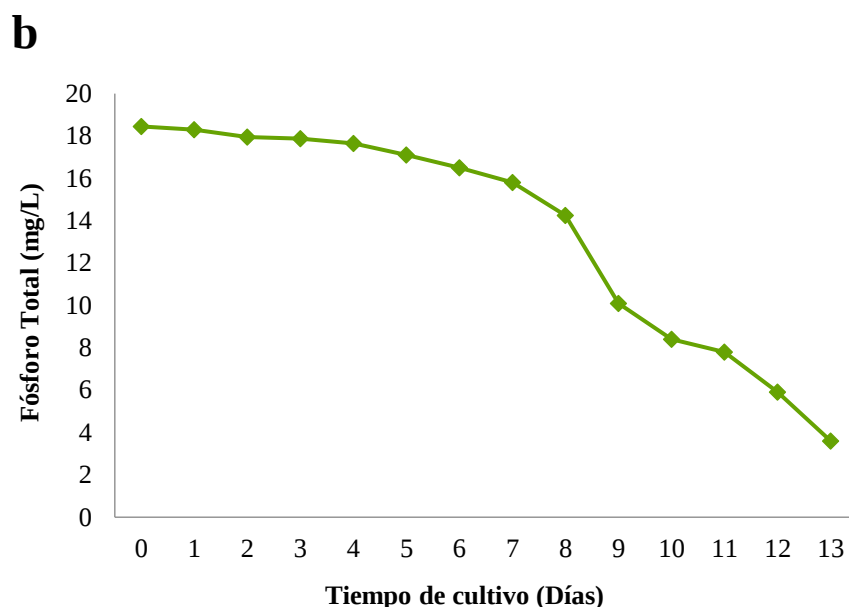


Figura 10b. Concentración de fósforo en consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino.

En el eje de las ordenadas se presenta concentración de fósforo en (mg/L) y en el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días.

Se observó en la Figura 10B, que el porcentaje de remoción de fósforo en el medio de cultivo de faenamiento porcino va subiendo al pasar de los días, empieza con 0% de remoción en el día de cultivo es decir el día 0, el día 8 tiene un 22,76% de remoción y al finalizar los días termina con un porcentaje de remoción de fósforo de 80,48%. En la Figura 10b se observa como decrece la cantidad de fósforo del agua residual de faenamiento porcino progresivamente con el pasar de los días, el día 0 tiene $18,45 \pm 0,07$ mg/L y al finalizar el tiempo de cultivo el día 13 termina con $3,6 \pm 0,707$ mg/L.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

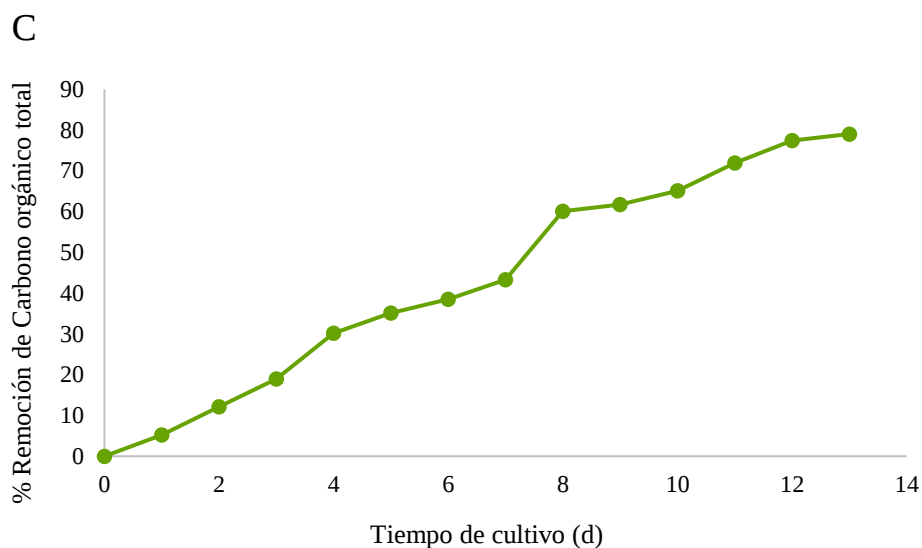


Figura 10C. Porcentaje de remoción de carbono total en consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta % de remoción y en el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días.

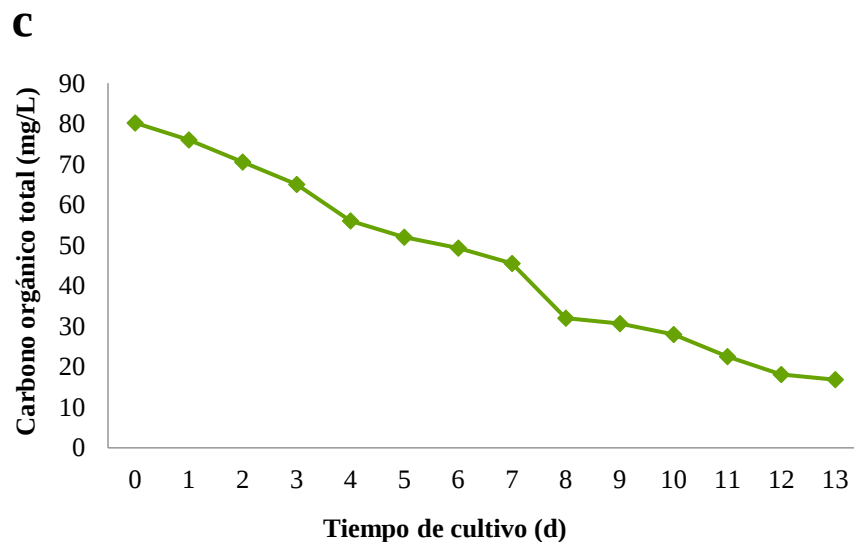


Figura 10c. Concentración de carbono en consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta concentración de carbono en (mg/L) y en el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

En la Figura 10C, se puede observar el crecimiento que existió en el porcentaje de remoción de carbono; así mismo, se observa que no fue tan alta como con el fósforo o nitrógeno, en el día 1 la remoción fue poca con un valor de 5,23%, para el día 6 existió una remoción de 38,52% y finalmente al llegar el día 13 se obtuvo una remoción de 79,03%. En la Figura 10c se observa como descienden los valores de carbono en el agua de faenamiento porcino, ya que en el día 0 empieza con un valor de $80,2 \pm 4,94$ mg/L y el día 13 termina únicamente con $16,81 \pm 3,53$ mg/L.

En la Figura 11 se muestran los porcentajes de remoción que existieron en cada nutriente (NT, PT, CT) en la cual se podrán ver sus diferencias y características individuales tanto del consorcio como de las especies de microalgas por separado obtenido por Herrera (2021).

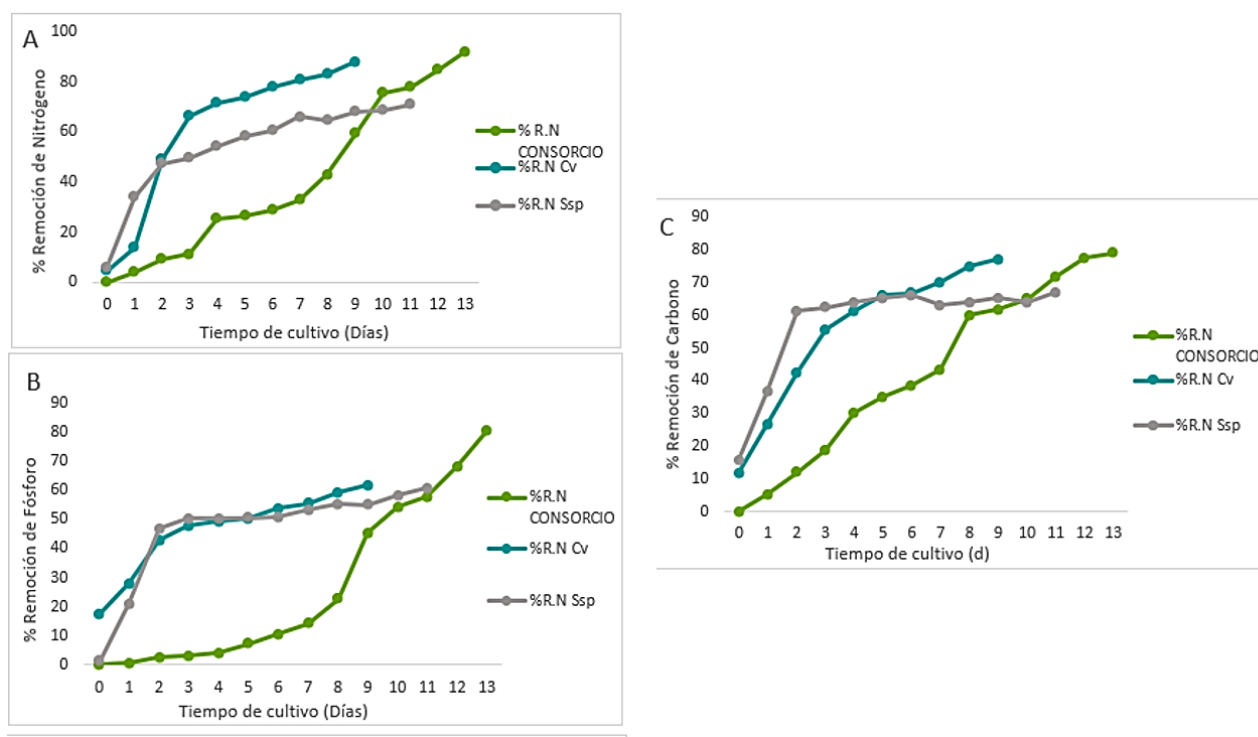


Figura 11. Porcentaje de remoción de nutrientes de consorcio microalgal, *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta el porcentaje de remoción

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

de nutrientes A % de remoción de nitrógeno total. B % de remoción de fósforo total. C % de remoción de carbono total. En el eje de las abscisas se expresa el tiempo de cultivo en días. Cv: *Chlorella vulgaris*, Ssp: *Scenedesmus* sp..

Tabla 6. Remoción de nutrientes obtenido del consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino y límites máximos permisibles de descarga al sistema de alcantarillado público por parte de la norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua del Ecuador. Los valores se expresan como resultado del promedio de triplicados y su desviación estándar.

Parámetros Físicoquímicos	Concentración Inicial	Concentración Final	Remoción Total (%)	Límite máximo permisible
Nitrógeno Total (mg/l N)	49 ± 1, 41	4 ± 2,82	91,83	60,0
Fósforo Total (mg/l PO4-3)	18,45 ± 0,07	3,6 ± 0,70	80,48	15,0
Carbono Total (mg/l C)	80,2 ± 4,94	16,81 ± 3,53	79,03	No Aplica
Calcio (mg/L)	23,89 ± 0,72	17,64 ± 0,07	26,16	No Aplica
Cobre (mg/L)	0,059 ± 0,004	0,030 ± 0,002	49,15	1,0
Cromo (mg/L)	<0,05 LC	<0,01 LD	*	0,5
Hierro (mg/L)	1,88 ± 0,11	0,33 ± 0,02	82,45	25
Molibdeno (mg/L)	<0,1 LC	0,040 ± 0,003	-	No Aplica
Nitrógeno Amoniacal (mg/L)	71,97	8,19 ± 0,49	88,62	60,0
Níquel (mg/L)	<0,05 LC	<0,05	*	2,0
Plomo (mg/L)	<0,05 LC	<0,05 LD	*	0,5
Potasio (mg/L)	25,1 ± 1,7	43,15 ± 2,93	-	No Aplica
Sodio (mg/L)	50,3 ± 3,2	44,00 ± 3,56	12,52	No Aplica
Turbidez (NTU)	473	34,30	92,75	No Aplica

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

5.4 Determinación de Lípidos, AGL y FAME

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

5.4.1 Extracción de Lípidos Totales

Los resultados de extracción total de lípidos obtenidos de consorcio microalgal cultivada en agua residual de faenamiento porcino se observa en la Figura 12, se usaron los seis solventes extractores, cloroformo:metanol (1:2), hexano, metanol, etanol, acetato de etilo y metilciclohexano; respectivamente para biomasa seca y biomasa húmeda. Se obtuvo una producción total de lípidos de 0,0206 g/L/d con biomasa húmeda y 0,0093 g/L/d con biomasa seca. El mejor solvente extractor para biomasa húmeda fue el hexano con 6,565 % con una productividad de 0,141 g/L/d, el segundo mejor solvente con 5,687% fue el etanol obteniendo una productividad de 0,117 g/L/d, entre los solventes que menos porcentaje de lípidos generaron están el metanol con una productividad de 0,091 g/L/d y 4,425% y como último el metilciclohexano con 2,082% y productividad de 0,043 g/l/d. Estos porcentajes de lípidos fueron menores a los obtenidos con biomasa seca, ya que como se observa los porcentajes lipídicos en biomasa húmeda varían entre 2 a 6 %; mientras que en la biomasa seca existe un porcentaje de extracción lipídico que va de 10 a 30 %.

Para la biomasa seca el mejor solvente extractor fue metilciclohexano con un 30,542% y productividad de 0,283 g/L/d, el segundo mejor solvente fue el cloroformo:metanol (1:2) con 21,462% y productividad de 0,199 g/L/d, dentro de los solventes extractores que menos porcentaje lipídico generaron están el acetato de etilo con 12,774% y productividad de 0,118 g/l/d, finalmente el solvente extractor menos favorable fue el etanol, con una productividad de 0,097 g/L/d y un porcentaje de extracción de 10,534%.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

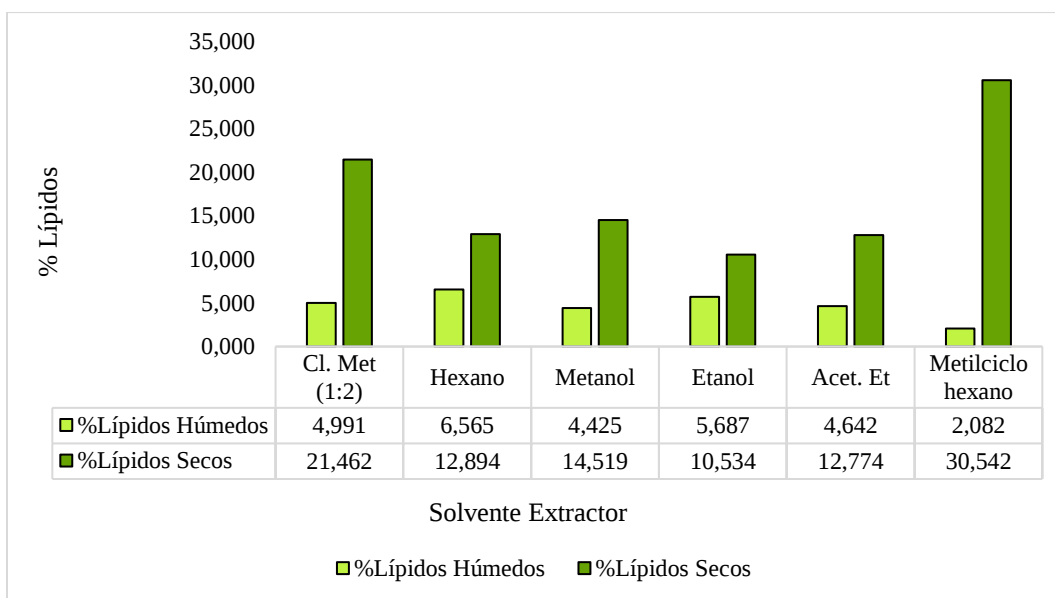


Figura 12. Extracción de lípidos en biomasa seca y húmeda de consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta % de remoción de lípidos y en el eje de las abscisas se expresan los solventes extractores usados.

5.4.2 Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL)

Los resultados obtenidos en la extracción de ácidos grasos libres en biomasa seca se pueden observar en la Figura 13. El porcentaje de extracción va de 28 a 41 %; siendo el mejor solvente extractor el cloroformo:metanol (1:2) con 41,044%, seguido del etanol con 36,3 % y metilciclohexano que extrajo 35,074% de AGL. Estos estuvieron entre los tres mejores solventes extractores, seguidos de metanol que obtuvo un 34,153% dejando los dos solventes más bajos, encontrándose valores menores al 30%, estos fueron el acetato de etilo con un porcentaje de extracción de 29,306% y el hexano con un 28,996% de extracción.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

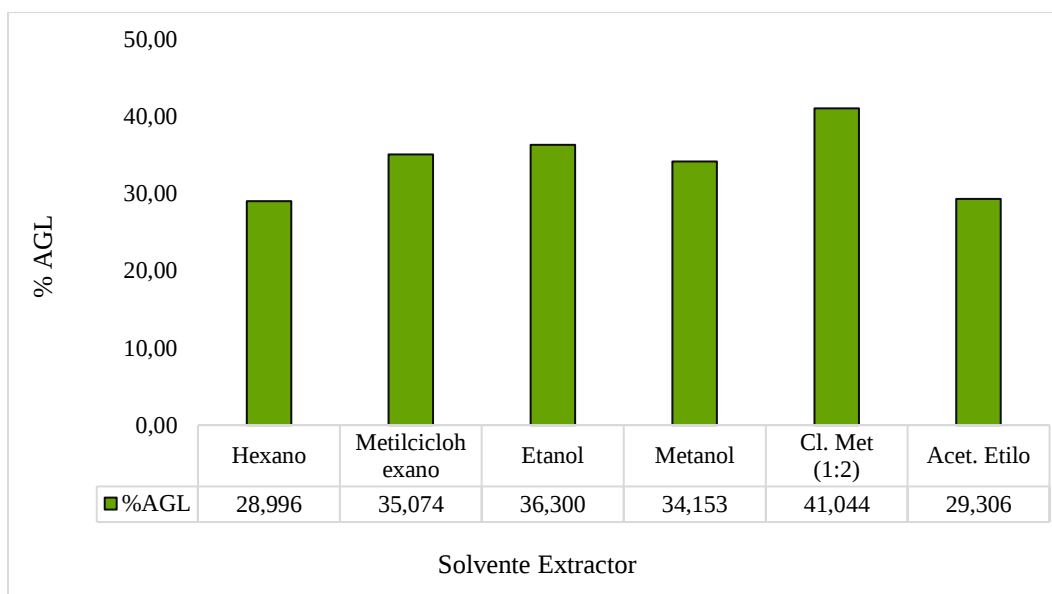


Figura 13. Extracción de Ácidos Grasos Libres en biomasa seca de consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta % de remoción de AGL y en el eje de las abscisas se expresan los solventes extractores usados.

5.4.3 Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME)

La extracción de FAME (Figura 14) se realizó en tres procesos y con la ayuda de dos catalizadores ácidos, homogéneo (H_2SO_4) y heterogéneo (Resina comercial CT-269); para el primer procedimiento que fue de manera directa ocupando biomasa seca con la presencia de los catalizadores, se obtuvo que con el catalizador ácido homogéneo la extracción fue mayor, obteniendo un porcentaje de 28,92% de FAME, al contrario del solvente ácido heterogéneo que se obtuvo un porcentaje de 15,621 % existiendo un amplio rango de diferencia entre los dos como se observa en la Figura 14A.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

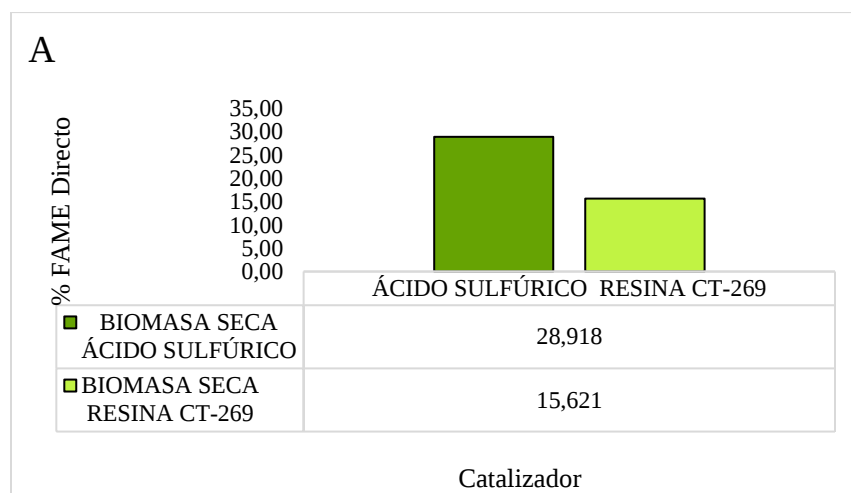


Figura 14A. Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME) de forma Directa en biomasa seca de consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta % de remoción de FAME y en el eje de las abscisas se expresan los catalizadores usados.

Para la extracción de FAME indirecto en seco y húmedo se observan los resultados en la Figura 14B. Para la extracción con biomasa húmeda se usaron los tres mejores solventes que en este caso fueron etanol, hexano y metilciclohexano y los dos catalizadores ácidos anteriormente mencionados, teniendo como resultado una mejor extracción usando hexano con catalizador de resina obteniendo un valor de 22,4 %, el segundo mejor solvente extractor fue el etanol usando ácido sulfúrico como catalizador el cual arrojó un valor de 10,15 %, a este le sigue el metilciclohexano con ácido sulfúrico dando un valor de 9,45%, el etanol con resina registrando un valor de 8,4 % y finalmente los dos solventes que menos valores arrojaron fueron el hexano con ácido sulfúrico y el metilciclohexano con resina, registraron valores de 7,35 % y 4,6 % respectivamente (Figura 14B1).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

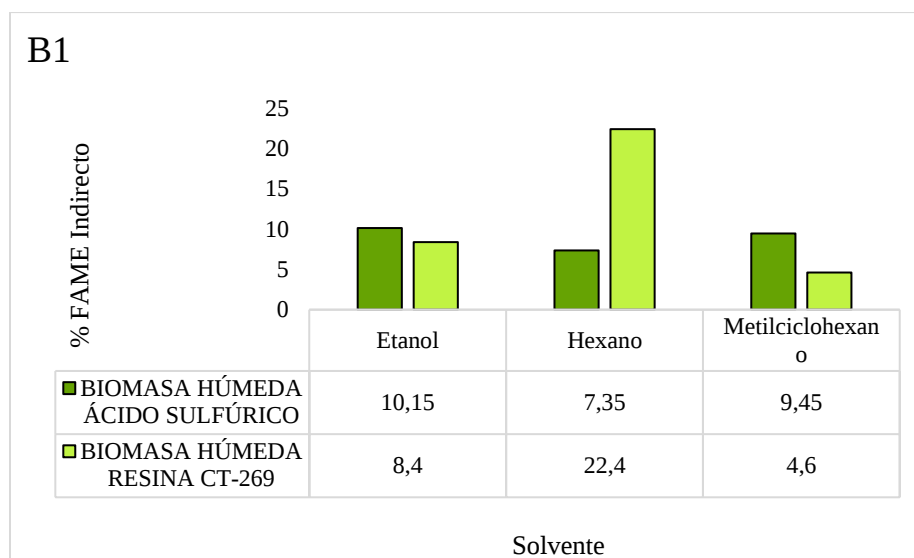


Figura 14B1. Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME) de forma Indirecta en biomasa húmeda de consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta % de remoción de FAME y en el eje de las abscisas se expresan los solventes extractores usados, con sus respectivos catalizadores.

Para la extracción con biomasa seca se usaron los tres mejores solventes que en este caso fueron cloroformo:metanol (1:2), metanol y metilciclohexano y los dos catalizadores ácidos anteriormente mencionados, teniendo como resultado una mejor extracción, por mucho, usando catalizador ácido homogéneo para los tres solventes, el solvente con mayor extracción de FAME fue el cloroformo:metanol (1:2) el cual registró valores de 19,55%, seguido del metilciclohexano con 11,75 % y finalmente el metanol con 10,25 %; para el catalizador ácido heterogéneo el metilciclohexano fue el que expresó mayor porcentaje de extracción con un valor de 1,8%, seguido del cloroformo:metanol (1:2) con 1,45 % y finalmente el metanol con 1,3 % (Figura 14B2).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

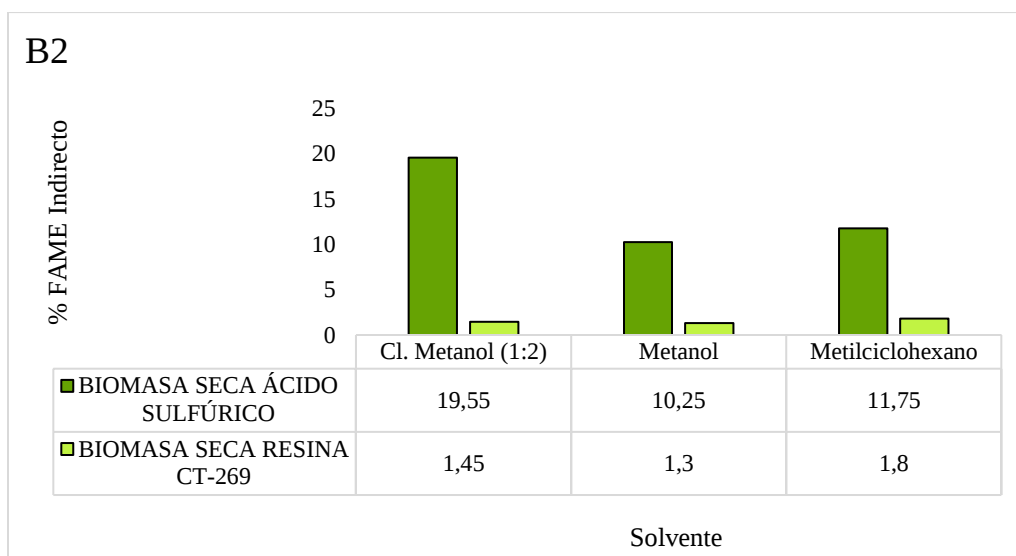


Figura 14B2. Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME) de forma Indirecta en biomasa seca de consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta % de remoción de FAME y en el eje de las abscisas se expresan los solventes extractores usados, con sus respectivos catalizadores.

Para el último procedimiento que fue la producción de FAME a partir de AGL (Figura 14C), presentó mejores resultados la extracción con catalizador homogéneo, es decir, ácido sulfúrico, el mejor solvente fue el hexano dando un valor de 95,65 %, seguido del cloroformo:metanol (1:2) con una extracción de 92,9 %, metanol con 91,8%, metilciclohexano con 91,55 %, etanol 90,8 % y finalmente el solvente menos extractor fue acetato de etilo con 87,5 %. El catalizador heterogéneo, en esta extracción, mostró valores mucho más bajos, la extracción con cloroformo:metanol (1:2) fue de 12,9 %, seguido de metilciclohexano, hexano y metanol que dieron valores de 5,9 %, 4,4 % y 2,05 % respectivamente, finalmente los dos solventes extractores con valores menores al 2 %, fueron el etanol que mostró una extracción de 1,75 % y el acetato de etilo con 1,695 % de extracción; tanto para ácido sulfúrico y resina el acetato de etilo fue el que reportó porcentajes más bajos de extracción de FAME en este procedimiento.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

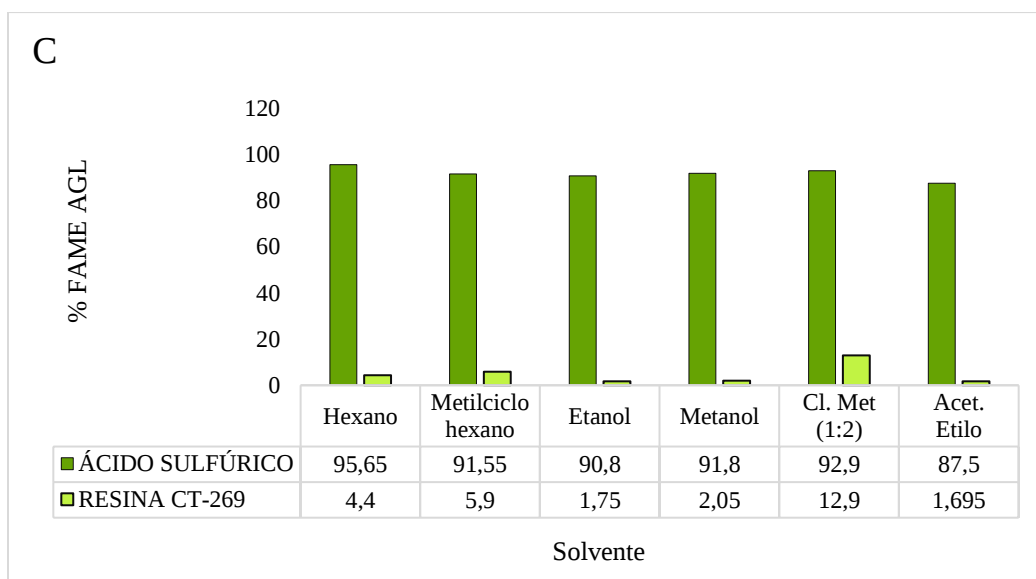


Figura 14C. Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME) a partir de AGL de consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. En el eje de las ordenadas se presenta % de remoción de FAME a partir de AGL y en el eje de las abscisas se expresan los solventes extractores usados, con sus respectivos catalizadores.

5.5 Cromatografía de capa fina (Thin layer chromatography – TLC)

Los resultados obtenidos en la cromatografía de capa fina se visualizan en la Figura 15, donde se puede ver la corrida que tuvo cada una de las muestras, el control que se realizó con un éster de colesterol y las muestras de ácidos grasos libres obtenida de la extracción de los mismos usando cloroformo:metanol (1:2), seguida de la muestra con FAME de AGL con cloroformo:metanol (1:2) como solvente extractor y ácido sulfúrico como su catalizador homogéneo.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

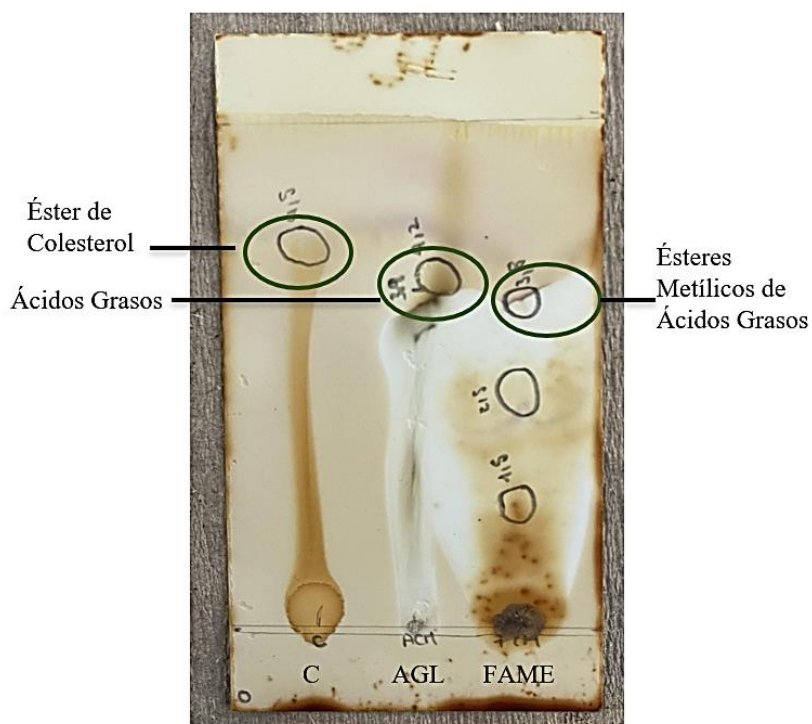


Figura 15. Cromatografía de Capa Fina de AGL y FAME obtenidos a partir de consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino. AGL: Ácidos Grasos Libres, FAME: Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos.

Usando como fase móvil, para la capilaridad de la placa de gel de sílice el cloroformo:metanol (1:2), se observa las distancias recorridas por cada una de las muestras colocadas, las mismas que se explican en la Tabla 6; logrando su identificación mediante comparaciones bibliográficas con su respectivo factor de retención (R_f) en cada muestra.

Tabla 7. Factor de Retención (R_f) de AGL y FAME obtenido del consorcio microalgal en medio de cultivo de faenamiento porcino. P: distancia total (cm), V: distancia recorrida por la muestra (cm).

MUESTRA	P (cm)	V (cm)	R_f
Estándar	6	4,5	0,75
AGL	6	4,2	0,70
FAME de AGL	6	3,8	0,63

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Caracterización del agua residual de faenamiento porcino mediante análisis de parámetros fisicoquímicos

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento y reproducción de microalgas es uno de los componentes principales tanto para sistemas abiertos y cerrados, que es el caso de la presente investigación trabajando con un fotobiorreactor; el medio debe satisfacer los macronutrientes y micronutrientes necesarios para el desarrollo y mantenimiento de las microalgas, los requerimientos en un medio de cultivo para microalgas son factores físicos como la temperatura de 15 a 22 °C, fotoperiodos de 12:12 (luz:oscuridad) e intensidad lumínica de aproximadamente 60-80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y factores químicos como la salinidad de 0-37%, el pH de 7 a 9, nutrientes como el carbono, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro, entre otros y en algunos casos vitaminas como biotina (Tenorio *et al.*, 2018). Es por esta razón que se realizó una caracterización del agua residual de faenamiento porcino para asegurarse que este medio de cultivo tenga y cumpla con la presencia de estos factores químicos y sea un medio viable de cultivo y crecimiento para el consorcio microalgal empleado (Tabla 4).

La comparación se realizó con medio BBM, el cual se ha demostrado que es un medio de cultivo apto y viable para el crecimiento de microalgas y de consorcios de las mismas, como referencia tenemos el estudio de Subía & Rubio (2018) en el cual realizan la evaluación de biomasa de microalgas de la laguna de Limoncocha como materia prima para la obtención de biocombustibles, en su estudio usan dos tipos de consorcios de microalgas y su medio de cultivo es BBM, obteniendo resultados favorables de crecimiento celular que van de 5030000 cel/mL a 5537636 cel/mL. De

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

igual manera se consideró al agua residual de faenamiento porcino un medio de cultivo prometedor ya que hay investigaciones previas que demuestran que es un medio viable en el cual las microalgas crecen en condiciones óptimas como el estudio de (Medrano – Barboza *et al.*, 2021) donde se investiga el uso de aguas residuales de porcicultura y faenamiento para el crecimiento y obtención de biomasa algal de *Chlorella vulgaris* y el estudio de Herrera (2021) en donde se investiga la obtención de lípidos a partir de biomasa cultivada en agua residual de origen porcino, obteniendo en ambos estudios resultados favorables al momento de usar el agua residual de faenamiento porcino como un medio de cultivo.

6.2 Determinación del Crecimiento Celular

6.2.1 Densidad Óptica

En la Figura 7, se puede observar que el presente estudio con consorcio genera una menor absorbancia con un valor de 0,4077 a 680 nm a diferencia de la reportada en el estudio de Herrera (2021) con un valor de 2,168 a 680 nm alcanzado por *Chlorella vulgaris*. De igual manera se ve que para *Scenedesmus* sp. existe un mayor alcance en cuanto a la absorbancia a comparación con el consorcio. Estos datos pueden ser ya que la concentración de nitrógeno amoniacal en el agua residual de faenamiento porcino usada en este estudio es mayor a 50 mg/L (Costecam, 2017) y aunque este elemento es necesario para el crecimiento celular de las microalgas, un valor muy alto de nitrógeno amoniacal puede reducir el crecimiento celular por toxicidad (Jia *et al.*, 2016).

6.2.2 Conteo Celular

Después del estudio realizado se observa una comparación entre una investigación individual de las especies *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* cultivadas en agua residual de faenamiento

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

porcino realizado por Herrera (2021) y la presente investigación usando un consorcio de las mismas, los resultados se expresan en la Figura 8. En la fase de adaptación se ven valores muy similares para las dos especies por separado y en consorcio; sin embargo, cuando inicia la fase de crecimiento exponencial del día dos al día cinco *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* muestran un mayor crecimiento. En la fase estacionaria que va del día cinco al ocho dependiendo de la especie, el consorcio alcanza mayores valores que *Scenedesmus* sp., aun así *Chlorella vulgaris* alcanza valores de concentración celular mayores; al momento de su fase de muerte que empieza a partir del día 8 se ve que *Chlorella vulgaris* no tiene un decaimiento fuerte en sus valores de concentración y *Scenedesmus* sp. tampoco, a diferencia del consorcio que baja nuevamente a como se mantenía en la fase de adaptación y crecimiento exponencial. ,

En la figura 8 también puede observarse que *Scenedesmus* sp. no varía mucho en sus fases, a diferencia de *Chlorella vulgaris* o el consorcio que si tienen un pico de concentración celular y decrecen nuevamente. También es importante tener en cuenta la cantidad de días de cultivo que tuvo cada especie, en *Chlorella vulgaris* fueron 9 días de cultivo, *Scenedesmus* sp 11 y consorcio 13 días, a ninguno de los cultivos se les realizó reposición de nutrientes durante su tiempo de sembrado y para los tres cultivos existió un control de temperatura, pH, aireación y fuente lumínica.

Según un estudio realizado por Reynolds (2006) menciona que la especie *Chlorella vulgaris* resalta por su crecimiento bien caracterizado entre las microalgas planctónicas y sus propiedades fotosintéticas. Según evidencia bibliográfica se ve también que su alta capacidad de reproducción le permite crecer eficazmente frente a prominentes cantidades de nutrientes, como los que ofrece el medio BBM y el agua residual de faenamiento porcino utilizada en el presente estudio, la cual

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

presenta sobre todo una gran cantidad de fósforo total (21,6 mg/L) (Forero., Montenegro., Pinilla., Melgarejo., 2016). Por esta razón se puede observar en la Figura 8, que el crecimiento de *Chlorella vulgaris* es mayor a comparación de *Scenedesmus* sp., y el consorcio al estar formado también por *Chlorella vulgaris* tiene ese pico que genera una similitud entre los dos cultivos.

En el estudio realizado por Malagón & Suárez (2020), sobre la influencia de la concentración inicial de *Chlorella vulgaris* y CO₂ en la producción de lípidos, *Chlorella vulgaris* llegó a su máximo crecimiento el día cinco alcanzando una concentración de $2,86 \times 10^7$ cel/mL, comparada al presente estudio que el día de su crecimiento máximo fue el día 6 con $3,78 \times 10^6$ cel/mL, se puede decir que el consorcio se encuentra en buenas condiciones de crecimiento, sin embargo, el crecimiento de *Chlorella vulgaris* sigue siendo mayor al estar individualmente.

6.2.3 Peso Seco

En la Figura 9, se observan los valores de peso seco que se obtuvieron en el presente estudio usando consorcio microalgal, los cuales demuestran ser mucho más bajos a los obtenidos en el estudio de Herrera (2021); sin embargo, Herrera (2021) menciona en su estudio que sus valores fueron igualmente bajos a comparación con otros estudios como el de Wen *et al.*, (2017) quienes cultivaron *Chlorella vulgaris* en aguas residuales porcinas diluidas con BG11, encontrando valores de peso se de hasta 0,78 g/L; demostrando que se puede obtener un mejor valor de peso seco en aguas residuales diluidas, recordando que para el presente estudio y el estudio de Herrera (2021) las aguas residuales de faenamiento porcino no fueron diluidas previo al cultivo.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

6.3 Caracterización del agua residual postcosecha para la verificación de remoción de nutrientes

La remoción de nutrientes realizadas dentro de este estudio, tanto de nitrógeno, fósforo y carbono orgánico total, se ven en la Figura 11. La remoción de nitrógeno total para consorcio microalgal fue de $91,83\% \pm 2,82$, lo cual fue más de lo esperado ya que se esperaba como mínimo una remoción del 80% pero estos valores de $11,83\%$ más son muy prometedores; además, se encuentra en un rango mayor a comparación con el estudio de Herrera (2021) que obtuvo para *Scenedesmus* sp. $70,67\% \pm 1,41$ y para *Chlorella vulgaris* $87,89\% \pm 3,53$ en el cual trabajo con las especies por separado y se puede observar una diferencia de días en cuanto al tiempo de cultivo como se ve en la Figura 11A, del día 0 al día 9 las especies por separado representan una mayor remoción de nutrientes; sin embargo, al pasar los días *Scenedesmus* sp. baja su porcentaje de remoción de nitrógeno a diferencia del consorcio que sigue aumentando su porcentaje hasta llegar a $91,83\% \pm 2,82$.

En la Figura 11B se puede observar que ocurre una situación similar, la remoción de fósforo con consorcio genera un valor de remoción total de $80,48 \pm 0,70$, mientras que para *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris* hay un porcentaje de $60,91\% \pm 1,62$ y $61,92\% \pm 0,35$ respectivamente; es claro que el consorcio genera un porcentaje de remoción mayor; aun así, es importante señalar que del día 0 a 11 las dos especies por separado tienen porcentajes más altos que el consorcio; sin embargo, el consorcio alcanza un porcentaje total mayor, por lo cual sería interesante probar las especies por separado dejándolas un mayor tiempo de cultivo.

Finalmente, la remoción de carbono orgánico total para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. (Figura 11C), fue de $77,08\%$ y $67,12\%$ respectivamente dentro del estudio de Herrera (2021),

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

mientras que en el presente estudio la remoción fue de $79.03\% \pm 3.53$. Estos porcentajes que son bajos en comparación de los obtenidos en nitrógeno y fósforo pueden verse así ya que las microalgas no usan para su crecimiento ciertos compuestos de carbono, al no necesitarlos no los absorben y por esto se puede ver estos valores bajos a diferencia de los nutrientes antes mencionados; por otra parte el porcentaje de remoción mayor en el consorcio puede darse ya que se encuentran las dos especies de microalgas juntas por lo cual para su crecimiento pueden necesitar y absorber más de este nutriente.

En base a bibliografía (Domínguez *et al.*, 2020) se ha visto que una forma de obtener un porcentaje alto de remoción de nutrientes es mediante cultivos inmovilizados, conocidos como fotobiorreactores tipo biofilm, su mecanismo de operación destaca ya que tienen los microorganismos adheridos en una matriz polimérica, las ventajas de esto es que genera un ahorro de operación y simplifica el cosechado. En la actualidad, para la remoción de nutrientes, el reactor biofilm rotativo es el que mayor eficiencia representa con valores entre $2.1 \text{ g/m}^2 \cdot \text{día}$ de fósforo y $14.1 \text{ g/m}^2 \cdot \text{día}$ de nitrógeno (Christenson & Sims, 2012).

A diferencia de los porcentajes obtenidos en el presente estudio que son de 79,03%, 91,83% y 80,48% para carbono, nitrógeno y fósforo, respectivamente. Los datos generados por Posadas *et al.*, (2013) con fotobiorreactores tipo biofilm describen que pueden tener valores de remoción de carbono, nitrógeno y fosforo de 91%, 70% y 85%; respectivamente; lo que demuestra un mayor porcentaje de remoción en carbono y fósforo. Sin embargo, en cuanto a nitrógeno, en el presente estudio se ha obtenido un mayor porcentaje de remoción con un 21,83%. Como observación es importante mencionar que, aunque estos sistemas de fotobiorreactor sean una buena fuente de eliminación de nutrientes, la inmovilización generada sobre las células genera un acceso limitado

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

a la luz y al medio lo que reduce la tasa de crecimiento y productividad de biomasa, por lo que en este estudio no sería muy favorable este tipo de fotobiorreactor ya que un factor importante es la buena productividad de biomasa microalgal (Domínguez *et al.*, 2020).

La tabla 6 indica la remoción de nutrientes obtenidos del consorcio microalgal comparando concentración de nutrientes presentes en estado inicial es decir el agua apenas se la obtuvo y en estado final, posterior a los 13 días de cosecha de consorcio; se presentó una remoción en parámetros fisicoquímicos como el calcio, cobre, hierro, nitrógeno amoniacal, sodio y turbidez, con una remoción total de 26,16%, 49,15%, 82,45%, 88,62%, 12,52% y 92,75% respectivamente para cada uno; sin embargo, para el resto de parámetros no fue posible detectar ningún porcentaje de remoción con respecto a la sensibilidad de la técnica utilizada.

El calcio, hierro, cobre y sodio son micronutrientes utilizados en una concentración pequeña como catalizadores que aportan en las funciones reguladoras osmóticas, mientras que el nitrógeno es un macronutriente que sirve en el crecimiento y mantenimiento de las células; la existencia de todos estos parámetros es fundamental para verificar un medio de cultivo viable ya que son compuestos nutricionales que aportan la formación de las microalgas y el mantenimiento de las mismas (Tenorio *et al.*, 2018).

Así como cada uno de estos parámetros representa para las células el mantener la presión osmótica y el equilibrio de electrolitos en el caso de los macronutrientes y actuar como cofactores de enzimas en el caso de los micronutrientes (Fernandez, 2014), es importante recordar que las microalgas son también un medio prometedor de biorremediación en el cual los nutrientes juegan también un papel importante, dentro de la tabla 6 y el anexo 1 se puede ver igualmente una comparación con los límites máximos permisibles para la descarga al sistema de alcantarillado público, dentro de esta

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

comparación se obtienen valores prometedores ya que la concentración final de los nutrientes es menor a los valores máximos permisibles. En el año 2016 se realizó un monitoreo de descargas líquidas dentro de la Empresa de Rastro Quito en donde el parámetro que no cumple con los límites máximos permisibles es el fósforo con un valor de 21,6 mg/L (Costecam, 2017), como resultado de este estudio trabajando con el consorcio para la remoción de nutrientes se obtuvo un valor de 3,6 mg/L de concentración final, es decir que, usar el consorcio microalgal de la presente investigación como un medio de biorremediación en el agua de faenamiento porcino de la Empresa de Rastro Quito es una herramienta viable según la remoción obtenida.

Dentro de las plantas de tratamiento de aguas residuales, los efluentes secundarios PTAR cuentan con la presencia y composición nutricional antes mencionado que permiten el desarrollo de las microalgas, estas al consumir nutrientes como carbono, fósforo, nitrógeno, potasio, hierro, sodio, calcio y magnesio dan origen al tratamiento terciario y así mismo a la producción de biomasa microalgal (Beltran – Rocha *et al.*, 2017), es por esta razón que la relación microalgas y nutrientes presentes en aguas residuales se considera una simbiosis, obteniendo la limpieza de las aguas y producción de biomasa microalgal.

6.4 Determinación de Lípidos, AGL y FAME

6.4.1 Extracción de Lípidos Totales

En la Figura 12. Se observa la extracción de lípidos de consorcio microalgal con biomasa húmeda y seca, usando seis diferentes solventes; los valores más altos se obtuvieron con biomasa seca, usando como solvente extractor metilciclohexano 30,54% y cloroformo:metanol (1:2)

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

21,46%, en biomasa húmeda los porcentajes de extracción fueron menores al 7%, el mejor solvente fue hexano con 6,56%. En el estudio de Herrera (2021) la extracción lipídica con biomasa seca fue mayor con el mismo solvente, metilciclohexano con 18,91%, a diferencia de la biomasa húmeda ya que en su estudio obtuvo un mejor porcentaje con metilciclohexano 8,51%. Para la extracción lipídica en estos dos estudios se usaron los mismos solventes; sin embargo, puede variar el porcentaje de extracción de biomasa húmeda por el periodo que se esperó para realizar el proceso y el tiempo que la biomasa estuvo en contacto con el agua. En el presente estudio, la biomasa húmeda tuvo como segundo mejor solvente extractor el etanol con 5,68% ya que la polaridad del etanol y el agua son parecidas; además, ambas forman puentes de hidrógeno, entonces, la biomasa húmeda al estar un periodo largo en contacto con el agua encontró un buen solvente con una sustancia polar como el etanol.

Dentro del estudio de González *et al.*, (2021), el contenido de lípidos en la biomasa de consorcio fue de 19% en agua del grifo con 23,5% de aguas residuales porcinas y de 30% en agua de grifo con 39,75% de digestatos de aguas residuales porcinas, son valores que se encuentran en un rango similar al del presente estudio, tomando en cuenta que sus medios de cultivo están formados por una mezcla de aguas de grifo y aguas residuales porcinas. Así mismo como parte de su estudio usan un consorcio y lo hacen también con *Scenedesmus* sp. Por separado, para *Scenedesmus* sp. Obtienen porcentajes de 32% en agua del grifo con 23,5% de aguas residuales porcinas y 52% en agua de grifo con 39,75% de digestatos de aguas residuales porcinas. Lo que demuestra que para su medio de cultivo obtuvieron porcentajes mayores trabajando con la especie por separado y no en consorcio.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Según menciona Chen *et al.*, (2011) tanto la producción de biomasa como la acumulación de lípidos que se puedan encontrar en la microalga están limitados por varios factores, de los cuales los nutrientes que posean los medios de cultivo juegan un papel clave; menciona que el nitrógeno es un factor crítico para la regulación en el contenido lipídico de las células en las algas, nombra que cuando el nitrógeno se convierte en el factor limitante del crecimiento se produce el aumento de la acumulación de lípidos. Sin embargo, es importante encontrar un equilibrio ya que la limitación de nitrógeno produce la reducción en el crecimiento de las algas y esa reacción no es favorable.

6.4.2 Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL)

En la Figura 13, se observa la extracción de AGL de consorcio microalgal usando los seis diferentes solvente extractores y KOH como catalizador básico. El estudio de Herrera (2021) se realizó mediante la extracción de ácidos grasos libres de *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual de faenamiento porcino, cuyo resultado fue el 28% de ácidos grasos libres extraídos usando metilciclohexano, así mismo, para la extracción de AGL de *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas residuales porcinas su mejor solvente extractor fue el metilciclohexano con 45% de extracción. A diferencia de la actual investigación en la que el mejor solvente extractor con el que se trabajó fue el cloroformo:metanol (1:2) que generó un 41,04 % de extracción de ácidos grasos libres. Se observa claramente que los valores generados por *Chlorella vulgaris* son mayores en el estudio de Herrera (2021) trabajando con la especie individual. Así mismo, se puede ver que para las dos especies con las que trabaja su mejor solvente extractor se mantienen constante siendo este el metilciclohexano, comparado a la presente investigación en la cual el metilciclohexano forma

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

parte del tercer mejor solvente con 35,07% después de cloroformo:metanol (1:2) y etanol con 41,04% y 36,30% respectivamente.

En la investigación realizada por Cho *et al.*, (2013) en donde se usó *Chlorella vulgaris* liofilizada y mezclada con agua con el fin de obtener biomasa húmeda, se presentaron porcentajes de extracción de AGL de 8,76% usando como solvente cloroformo:metanol (1:2). Este resultado es menor a todos los solventes extractores usados en el presente estudio cuyos porcentajes de extracción varían entre 28,99% y 41,04% para el hexano y cloroformo:metanol (1:2) respectivamente.

Se pueden tomar en cuenta otros factores como la intensidad de la luz y concentraciones de CO₂ que ayudan con el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*. Un estudio realizado por Chang et al., (2017) donde trabaja con *Chlorella vulgaris* para mejorar la productividad de biomasa y lípidos reporta un porcentaje de extracción de 65,45 % - 68,47% de ácidos grasos insaturados, en este estudio utiliza como fuente de carbono un gas enriquecido en CO₂ al 5%, lo cual desempeña un papel importante en la síntesis y acumulación de lípidos, como también en su crecimiento celular; es importante según bibliografía no exceder a concentraciones mayores a 10% porque pueden disminuir los valores, las máximas tasas de crecimiento (1,6 d⁻¹) se registran con 5% y 8% de CO₂ (Maldonado, 2016)

6.4.3 Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME)

En la Figura 14, se observa la extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos de consorcio microalgal cultivado en agua residual de faenamiento porcino, usando tres procedimientos, con los mejores solventes y catalizadores homogéneo y heterogéneo. Dentro de la investigación de Herrera (2021) se encontraron resultados con los procedimientos de extracción directo, lípidos y AGL, usa

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

en su trabajo los tres mejores solventes en base a su proceso investigativo los cuales fueron acetato de etilo, cloroformo:metanol (1:2) y metilciclohexano, usando los dos catalizadores homogéneo y heterogéneo (ácido sulfúrico y resina CT-269). En su investigación se obtuvieron valores de FAME directo para *Chlorella vulgaris* con resina y ácido sulfúrico de 9,80% y 8,75% respectivamente, en el caso de *Scenedesmus* sp. se reflejaron valores de 15,50% con resina y 10,53% con ácido sulfúrico, estos valores difieren a los obtenidos en el actual estudio, en los que se obtuvieron valores de 28,92% con ácido sulfúrico y 15,62% con resina. Se puede observar que existe un gran rango de diferencia en los valores del procedimiento mediante ácido sulfúrico, sin embargo, para los valores con resina el rango de diferencia no es tan amplio para ninguna de las dos especies.

En el procedimiento de FAME con lípidos húmedos y secos los solventes extractores en el presente estudio fueron diferentes a los usados en el trabajo de Herrera (2021); a continuación, se comparará los resultados de los solventes similares usados en ambos trabajos; para biomasa húmeda con ácido sulfúrico el metilciclohexano fue uno de los tres mejores solventes extractores en el presente trabajo dio un porcentaje de 9,45% mientras que con resina dio un valor de 4,6 % estos valores registrados son mucho más bajos a los que se obtuvieron en el trabajo de Herrera (2021) para *Scenedesmus* sp. con 51% y 44% y para *Chlorella vulgaris* con 52% y 44,5% trabajando con resina y ácido sulfúrico, respectivamente. En este caso se ve una diferencia abismal al momento de trabajar con las especies por separado y con las especies en consorcio. Para biomasa seca con ácido sulfúrico el cloroformo:metanol (1:2) dio un porcentaje de extracción de 19,55% y el metilciclohexano 11,75% mientras que con resina fue de 1,45% y 1,8% para cloroformo:metanol (1:2) y metilciclohexano, respectivamente. Estos valores nuevamente son mucho más bajos a los registrados en el trabajo de Herrera (2021) donde obtuvo con *Scenedesmus* sp. un 52% con

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

metilciclohexano y 61% con cloroformo:metanol (1:2) trabajando con resina y con ácido sulfúrico obtuvo un 51, 5% y 47% para cloroformo:metanol (1:2) y metilciclohexano respectivamente, para *Chlorella vulgaris* se obtuvieron valores de 57,5% con metilciclohexano y 59,50% con cloroformo:metanol (1:2) trabajando con resina y con ácido sulfúrico obtuvo un 50,50% y 49,50% para cloroformo:metanol (1:2) y metilciclohexano, respectivamente. Como se evidencia es mucho más favorable en este procedimiento trabajar con las especies por separado ya que generan un mayor porcentaje de extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos respecto del consorcio de microalgas.

Para el procedimiento de extracción de FAME con AGL en el presente estudio se obtuvieron valores con ácido sulfúrico de 92,9%, 87,5% y 91,55% para cloroformo:metanol (1:2), acetato de etilo y metilciclohexano, respectivamente. Al trabajar con resina se obtuvieron valores de 12,9%, 1,69% y 5,9% para cloroformo:metanol (1:2), acetato de etilo y metilciclohexano, respectivamente. En este caso se pueden ver valores mayores a los registrados con los otros procedimientos, aun así, el mejor solvente para extracción de FAME con AGL fue el hexano ocupando como catalizador el ácido sulfúrico, el cual dio un porcentaje de extracción de 95,65%. En el trabajo de Herrera (2021) para la extracción de FAME en *Chlorella vulgaris* expresó valores de 73%, 80,50% y 56% trabajando con resina y 70,50%, 73% y 51% trabajando con ácido sulfúrico para cloroformo:metanol (1:2), acetato de etilo y metilciclohexano, respectivamente. Al trabajar con *Scenedesmus* sp. expresó valores de 71,50%, 89,50% y 65,50% trabajando con resina y 67,50%, 84% y 52,50% trabajando con ácido sulfúrico para cloroformo:metanol (1:2), acetato de etilo y metilciclohexano, respectivamente. Al momento de trabajar con resina se ve que el estudio de Herrera (2021) obtiene mayores valores de extracción de FAME trabajando por separado; sin

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

embargo, al trabajar usando como catalizador el ácido sulfúrico se ve que trabajar en consorcio como la presente investigación genera mayores porcentajes de extracción de FAME con AGL.

En base a bibliografía de un estudio realizado por Bermúdez (2018) donde trabaja con *Scenedesmus* sp. y solventes como acetato de etilo, éter de petróleo y éter etílico remplazando el cloroformo y etanol, isopropanol y terc-butanol en vez de metanol, afirma que la mayor extracción de FAME con HCl en los tratamientos con solventes orgánicos y alcoholes se explican por rompimiento de la pared celular y la liberación de lípidos. Menciona también que la combinación entre solventes apolares y próticos polares como los mencionados anteriormente aumentaron la extracción y los rendimientos proporcionando FAME insaturados de lípidos neutros.

6.5 Cromatografía de Capa Fina (Thin layer chromatography – TLC)

Para la cromatografía de capa fina, se puede ver en la Tabla 7, que se obtuvieron valores de factor de retención de 0,75 en el estándar, 0,70 AGL y 0,63 para FAME con AGL, en el presente estudio se utilizó como marcador para el perfil lipídico, es decir en el estándar un éster de colesterol, en la investigación realizada por Subía & Rubio (2018), usan como marcador para el perfil lipídico lecitina de soya, y para sus otras dos muestras (M1) y (M2) usaron consorcio de *Vischeria/Scenedesmus* sp. y *Chlorella/Monoraphidium Contortum* sp, respectivamente. Para los dos estudios se ocupa la misma fórmula para factor de retención y un protocolo similar; sin embargo, en la investigación de Subía & Rubio (2018) a diferencia de la presente investigación buscan obtener valores de fosfatidilserina, fofatildicolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina. Para M1 obtuvieron la presencia de fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina con un factor de retención de 0,25 y 0,87 respectivamente; para M2 obtuvieron la presencia de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

fosfatidicolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina con un factor de retención de 0,73, 0,23 y 0,85 respectivamente. Los valores obtenidos en los dos estudios para la identificación de compuestos lipídicos, aunque son diferentes los compuestos buscados, son similares y van en rangos parecidos, además que en sus representaciones gráficas tienen mucha similitud.

7. CONCLUSIONES

- En esta investigación se resaltan las propiedades del agua residual de faenamiento porcino como medio de cultivo apto para un consorcio microalgal compuesto por las especies *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*.
- Se determinó la eficiencia que tiene el medio de cultivo y las dos especies de microalgas, trabajando en consorcio para la remoción de nutrientes como el Nitrógeno, Fósforo y Carbono orgánico Totales; siendo esto de gran utilidad para biorremediación de aguas residuales.
- Se obtuvieron buenos porcentajes de lípidos totales y se determinaron los mejores solventes extractores para el consorcio microalgal estudiado siendo estos cloroformo:metanol (1:2), metanol y metilciclohexano.
- Se obtuvieron bajos porcentajes de extracción de ácidos grasos libres y ésteres metílicos de ácidos grasos, a través de los diferentes métodos y técnicas descritas; además, no se descarta su posible mejoramiento en las técnicas y condiciones del cultivo, con el consorcio de microalgas, para lograr en un futuro una producción de biocarburantes (combustibles verdes) más eficientes.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

- Los resultados obtenidos con la metodología empleada indican que no se cumplió por completo la hipótesis planteada en la presente investigación; ya que, se esperaba alcanzar un porcentaje de ácidos grasos libres mayor a 80%, lo cual no fue posible, se llegó a la mitad con un porcentaje de AGL de 41,044% con cloroformo:metanol (1:2) como mejor solvente extractor; sin embargo, se esperaba un porcentaje de lípidos mayor al 20% el cual se cumple, trabajando con biomasa seca y con los dos mejores solventes extractores que fueron, metilciclohexano y cloroformo:metanol (1:2) con un porcentaje de lípidos de 30,54% y 21,462%; respectivamente, cumpliendo parcialmente la hipótesis planteada al inicio de la investigación.

8. RECOMENDACIONES

- De acuerdo con diferentes autores e investigaciones, se recomienda el uso de fertilizantes inorgánicos, compuestos por N, P y K para enriquecer las aguas residuales, esto es una alternativa económica para el cultivo a gran escala de microalgas, así mismo, esta auxina representa un beneficio ya que regula el crecimiento de las plantas, aumenta su tasa de crecimiento, el contenido de lípidos, tolerancia al estrés y la productividad de biomasa en varias especies de microalgas. Un tipo de fertilizante usado en un estudio fue el fertilizante foliar Bayfolan (N:P:K, 11:1:1) el mismo contiene vitaminas, micronutrientes y ácido indolacético; los resultados fueron una producción de biomasa 2.0 veces mayor y una productividad 2.8 veces mayor trabajaron con *Scenedesmus* sp. y consorcio en este medio compuesto por aguas residuales tratadas enriquecidas con 1mL.L⁻¹ (González *et al.*, 2021).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Al ser una propuesta reciente y con buenos resultados puede ser una opción para aplicar y ver el rendimiento que se obtiene en comparación a los estudios ya dados.

- Otros investigadores aseguran la eficiencia de los fotobiorreactores tipo biofilm, asegurando una mayor remoción de nutrientes, con valores de 91%, 70% y 85% para la eliminación de carbono, nitrógeno y fósforo respectivamente (Posadas et al., 2013)
- Finalmente, algunos investigadores afirman que es importante la concentración de CO₂, mencionaron que un incremento de CO₂ de 0.04 a 8% en los cultivos de *Chlorella vulgaris*, aumento su concentración de biomasa y contenido lipídico, un buen aumento ha sido demostrado al tener valores de 5% y 8%, no más de eso (Maldonado, 2016).

9. RECONOCIMIENTO

Los reactivos y materiales del presente trabajo investigativo 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.

10. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, C., Chang, I., Tenorio, L., Ynga, G., Oscanoa, A., & Flores, L. (2011). Determinación De La Biomasa Microalgal Potencialmente Acumuladora De Lípidos Para La Obtención De Combustible. 1–20.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting, 1-6.
- Belkhanchi, H., Rouan, M., Hammi, M., Ziat, Y., & Chigr, M. (2021). Synthesis of biodiesel by transesterification of used frying oils (Ufo) through basic homogeneous catalysts (naoh and koh). *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(5), 12858–12868. <https://doi.org/10.33263/BRIAC115.1285812868>
- Bermudez-Sierra, José Jovanny. (2018). Extração de lipídios da microalga *scenedesmus* sp. Com diferentes mistura de solventes orgânicos. *Bioteecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 16(2), 88-98. <https://doi.org/10.18684/bsaa.16n2.1169>
- Beltrán-Rocha, Julio C, Guajardo-Barbosa, Claudio, Barceló-Quintal, Icela D, & López-Chuken, Ulrico J. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(3), 417-427. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001>
- Bligh, E., & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Bux, F., & Chisti, Y. (2016). *Algae Biotechnology - Products and Processes*. Springer International Publishing.
- Cabrera, N. A. (2016). Production and analysis of Biodiesel from the fruits of *Roystonea oleracea*. 18.
- Chang, H. X., Liao, Q., Fu, Q., Huang, Y., Xia, A., & Zheng, Y. P. (March de 2017). Phase-feeding strategy for *Chlorella vulgaris* to enhance biomass and lipid productivity. *Int. J. Agric. & Biol. Eng.*, 10(2), 205-215. doi: 10.3965/j.ijabe.20171002.2735 [[Phase-feeding strategy for Chlorella](#)]

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

[vulgaris to enhance biomass and lipid productivity | Haixing | International Journal of Agricultural and Biological Engineering \(abepublishing.org\)\]](#)

Chen M, Tang H, Ma H, Holland TC, Ng KYS, Salley SO. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour Technol.* 102(2):1649-1655.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.062>

[<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852410015750>]

Chia, M. A., Lombardi, A. T., & Melão, M. da G. G. (2013). Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 85(4), 1427–1438.

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

Christenson, L.B. & Sims, R.C. (2012). Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1674– 1684.

<https://doi.org/10.1002/bit.24451>.

Cho, H. S., Oh, Y. K., Park, S. C., Lee, J. W., & Park, J. Y. (2013). Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy*, 54, 156–160.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.08.031>

Costecam. (2017). Estudio de impacto ambiental (esia) ex post camal metropolitano de quito.

<http://www.epmrq.gob.ec/images/RendiciondeCuentas2020/Insumos/EIA%20CMQ%2003-12-2019.pdf>

Dejoye, C., Abert, M., & Chemat, F. (2013). New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *Bioresource Technology*, 134, 271–275.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.168>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

- Domínguez Gómez, M., Ruiz González, J., Garrido Pérez, C., & Perales Vargas-Machuca, J. A. (4 de junio de 2020). Phytoremediation of urban wastewater of small municipalities with microalgae. *Revista Científica Ecociencia*, 7, 27. <file:///C:/Users/ACER/Downloads/347-Texto%20del%20art%C3%ADculo-725-1-10-20200622.pdf>
- El Productor. (2022, septiembre 9). Pronaca apuesta por más consumo de carne de cerdo en Ecuador. *Elproductor.com*. <https://elproductor.com/2022/09/pronaca-apuesta-a-mas-consumo-de-carne-de-cerdo-en-ecuador/>
- Eladel, H., Abomohra, A. E. F., Battah, M., Mohammed, S., Radwan, A., & Abdelrahim, H. (2019). Evaluation of *Chlorella sorokiniana* isolated from local municipal wastewater for dual application in nutrient removal and biodiesel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(3), 425–433. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2046-5>
- Escobedo, Manuel Jimenez, & Calderón, Augusto Castillo. (2021). Biomasa microalgal con alto potencial para la producción de biocombustibles. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 265-282. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.030>
- Estévez, O. (23 de agosto de 2021). Cultivo de microalgas mediante el uso de fotobiorreactores. *Petroenergía*. <https://www.petroenergia.info/post/cultivo-de-microalgas-mediante-el-uso-de-fotobiorreactores>
- Fernandez, M. (2014). Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. *Microalgal Biotechnology*. Universidad de Almería. <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1--generalidades/1-3-nutrientes.html>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Forero-Cujiño, M. A., Montengro Ruiz, L. C., Pinilla-Agudelo, G. A., & Melgarejo-Muñoz, L. M. (2016).

Inmovilización de las microalgas *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) y *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) en esferas de alginato de calcio. *Acta Biologica Colombiana*, 21(2), 437–442.
<https://doi.org/10.15446/abc.v21n2.51253>

Gaspar, R. (2019). Universidad autónoma de baja california. Facultad de ciencias marinas biotecnología en acuacultura.

González-Falfán, Kevin A, Guerrero-Barajas, Claudia, Badillo-Corona, Jesús A, & Fernández-Linares, Luis C. (2021). Producción de metabolitos de *Scenedesmus* sp. y un consorcio microalgal cultivados en medios no convencionales. *Ciencias marinas*, 47(2), 89-103. Epub 02 de diciembre de 2022.<https://doi.org/10.7773/cm.v47i2.3138>

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

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

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

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

Hadrich, B., Akremi, I., Dammak, M., Barkallah, M., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2018). Optimization of lipids' ultrasonic extraction and production from *Chlorella* sp. using response-surface

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

methodology. *Lipids in Health and Disease*, 17(1), 1–9. [https://doi.org/10.1186/s12944-018-0702-](https://doi.org/10.1186/s12944-018-0702-z)

[z](https://doi.org/10.1186/s12944-018-0702-z)

Herrera Renjifo, K. (2021). Obtención de lípidos a partir de biomasa cultivada en agua residual de origen porcino. Universidad Internacional SEK.

Jia, Q., Xiang, W., Yang, F., Hu, Q., Tang, M., Chen, C., Wang, G., Dai, S., Wu, H., & Wu, H. (2016). Low-cost cultivation of *Scenedesmus* sp. with filtered anaerobically digested piggery wastewater: biofuel production and pollutant remediation. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 727–736. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0610-9>

Kumar, R. R., Rao, P. H., & Arumugam, M. (2015). Lipid extraction methods from microalgae: A comprehensive review. *Frontiers in Energy Research*, 3(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00061>

Lackner, M. (2021). Biocombustibles de tercera generación: bacterias y algas para un mejor rendimiento y sostenibilidad. En: Lackner, M., Sajjadi, B., Chen, WY. (eds) *Manual de Mitigación y Adaptación al Cambio Climático*. Springer, Nueva York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6431-0_90-2

Lobos, P. (2019). Uso de un consorcio microalgal para la remoción de nutrientes desde planta de tratamiento de aguas servidas [Tesis para la obtención del título de Ingeniera Ambiental, Universidad de Concepción]. Repositorio Universidad de Concepción <http://repositorio.udec.cl/jspui/bitstream/11594/9688/1/TESIS%20USO%20DE%20UN%20CONSORCIO%20MICROALGAL%20PARA%20LA%20REMOCION%20DE%20NUTRIENTES%20EN%20AGUAS%20SERVIDAS.pdf>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

- Malagón-Micán, Martha Lucía, & Suárez-Chaparro, Miryam Yesenia. (2020). Influencia de la concentración inicial de *Chlorella vulgaris* y CO₂ en la producción de lípidos. *Revista Lasallista de Investigación*, 17 (1), 59-69. Epub 27 de enero de 2021. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n1a5>
- Maldonado Barraza, C. R., & Orrantia Borunda, E. (Octubre del 2011). Induccion lipidica por limitacion de nutrientes en las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella sorokiniana* [Centro de investigación en materiales avanzados, s. C. Division de estudios de posgrado]. <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/2306/1/TESIS%20CARMEN%20MALDONADO%20TESIS-CIMAV%20-.pdf>
- Medrano-Barboza, J., Aguirre-Bravo, A. A., Encalada-Rosales, P., Yerovi, R., & Ramírez-Iglesias, J. R. (2021). Uso de aguas residuales de porcicultura y faenamiento para el crecimiento y obtención de biomasa algal de *Chlorella vulgaris*. *Bionatura*, 6(2), 1824–1831. <https://doi.org/10.21931/rb/2021.06.02.24>
- Nichols H.W., and H.C. Bold (1965) *J. Phycol.* 1, 34-38.
- Orus, A. (2022). Consumo de carne a nivel mundial por tipo 1990-2021. Recuperado de <https://es.statista.com/estadisticas/1330024/consumo-de-carne-a-nivel-mundial-por-tipo/>
- Orus, A. (2022). Producción mundial de carne de porcino 2012-2022. Recuperado de <https://es.statista.com/estadisticas/525525/produccion-mundial-de-carne-de-porcino/>
- Programa Mundial de la UNESCO de Evaluación de los Recursos Hídricos. (2017). Informe Mundial sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas 2017: Las aguas residuales: el recurso desaprovechado, resumen ejecutivo. Recuperado de https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247552_spa

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

- Posadas, E., García-Encina, P.A., Soltau, A., Domínguez, A., Díaz, I. & Muñoz, R. (2013). Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algalbacterial biofilm bioreactors. *Bioresour. Technol.* 139, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.008>.
- Ramos, Fernando Daniel; Díaz, María Soledad; Villar, Marcelo Armando; Biocombustibles; Asociación Civil Ciencia Hoy; *Ciencia Hoy*; 147; 1-1-2016; 69-73
- Reynolds C. *The ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press; 2006. 552 p.
- Rodríguez, J. V. (2008). Análisis de Lípidos de Biomembranas. In Rosario Argentina (Issue March). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4691.1529>
- Romero, M. G. (2020). Biocombustibles y producción de biohidrógeno. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, (38), 8.
- Salazar, L. E. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. *Universidad de Piura*, 145.
- Sánchez-Bayo, A., López-Chicharro, D., Morales, V., Espada, J. J., Puyol, D., Martínez, F., Astals, S., Vicente, G., Bautista, L. F., & Rodríguez, R. (2020). Biodiesel and biogas production from *Isochrysis galbana* using dry and wet lipid extraction: A biorefinery approach. *Renewable Energy*, 146, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.148>
- Subía, Soledad, & Rubio, Jefferson. (2018). Evaluación de biomasa de microalgas de la laguna Limoncocha como materia prima para la obtención de biocombustibles. *Enfoque UTE*, 9(2), 106-116. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.199>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

- Tenorio L, Hernández H, Aguirre M. (2018). Manual para obtención de cepas de microalgas. Inf Inst Mar Perú. 45(2): 277-291. file:///C:/Users/ACER/Downloads/Informe%2045(2)10.pdf
- Toumi, A., Politaeva, N., Đurović, S., Mukhametova, L., & Ilyashenko, S. (2022). Obtaining DHA–EPA Oil Concentrates from the Biomass of Microalga *Chlorella sorokiniana*. Resources, 11(2). <https://doi.org/10.3390/resources11020020>
- Tulsma. (2015). Anexo 1 del libro vi del texto unificado de legislación secundaria del ministerio del ambiente: norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua. <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/05/acuerdo-097.pdf>
- Vega, A. (2022). Obtención de Lípidos a partir de biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de origen acuícola. Universidad Internacional SEK.
- Wen, Y., He, Y., Ji, X., Li, S., Chen, L., Zhou, Y., Wang, M., & Chen, B. (2017). Isolation of an indigenous *Chlorella vulgaris* from swine wastewater and characterization of its nutrient removal ability in undiluted sewage. Bioresource Technology, 243(June 2017), 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.094>
- Yerovi Guzmán, R. (2020). Comparación de métodos de desinfección para aguas residuales de porcicultura destinadas al cultivo de *chlorella vulgaris*. Universidad Internacional SEK.
- Zhu, J., Chen, W., Chen, H., Zhang, X., He, C., Rong, J., & Wang, Q. (2016). Improved productivity of neutral lipids in *Chlorella* sp. A2 by minimal nitrogen supply. Frontiers in Microbiology, 7(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00557>

11. ANEXOS

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

ANEXO 1

Límites máximos permisibles de descarga al sistema de alcantarillado público

Parámetros Físicoquímicos	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Calcio	Ca	mg/L	No Aplica
Cobre	Cu	mg/L	1,0
Cromo	Cr	mg/L	0,5
Hierro	Fe	mg/L	25
Molibdeno	Mo	mg/L	No Aplica
			60,0
Nitrógeno Total	N	mg/L	
Níquel	Ni	mg/L	2,0
Plomo	Pb	mg/L	0,5
Potasio	K	mg/L	No Aplica
Sodio	Na	mg/L	No Aplica
Sólidos Totales	ST	mg/L	1 600,0
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg/L	500,0
Fósforo Total	P	mg/L	15,0

Obtenido de: Revisión del Anexo 1 del libro del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA): Límites máximos permisibles de descarga al sistema de alcantarillado público por parte de la norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua del Ecuador.

ANEXO 2

Crecimiento celular de consorcio microalgal en agua residual de Faenamiento Porcino.

Crecimiento Celular			
	Conteo Celular	Densidad Óptica (680nm)	Peso Seco (g/L)

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

Días	Agua Residual De Faenamiento Porcino							
0	1,08E+05	±	6,63E+03	0,34	±	0,011	0,0033	± 0,0025
1	1,88E+05	±	1,44E+04	0,35	±	0,020	0,0037	± 0,0008
2	2,41E+05	±	1,77E+04	0,36	±	0,002	0,00405	± 0,0043
3	2,64E+05	±	1,33E+04	0,36	±	0,004	0,00475	± 0,0049
4	3,04E+05	±	3,31E+03	0,37	±	0,002	0,0049	± 0,0018
5	3,73E+05	±	1,55E+04	0,37	±	0,001	0,00555	± 0,0015
6	3,78E+06	±	1,77E+05	0,41	±	0,006	0,00625	± 0,0008
7	3,15E+06	±	3,43E+05	0,37	±	0,001	0,0057	± 0,0016
8	2,61E+05	±	1,10E+04	0,34	±	0,002	0,0056	± 0,0062
9	2,57E+05	±	1,22E+04	0,33	±	0,004	0,00555	± 0,0062
10	2,54E+05	±	3,20E+04	0,33	±	0,005	0,0054	± 0,0001
11	2,51E+05	±	1,66E+04	0,32	±	0,004	0,0053	± 0,0008
12	2,16E+05	±	1,10E+04	0,32	±	0,003	0,00515	± 0,0033
13	1,98E+05	±	1,66E+04	0,32	±	0,002	0,005	± 0,0006

ANEXO 3

Concentración de nutrientes en consorcio microalgal en agua residual de Faenamiento Porcino.

Concentración de Nitrógeno, Fósforo y Carbono									
	Nitrógeno Total (g/L N)			Fósforo Total (g/L PO3-4)			Carbono Total (g/L C)		
Días	Agua Residual De Faenamiento Porcino								
0	49	±	1,414	18,45	±	0,000	80,2	±	4,950
1	47	±	1,414	18,3	±	0,919	76	±	1,414
2	44,5	±	3,536	17,95	±	0,212	70,5	±	4,950
3	43,5	±	0,707	17,88	±	0,071	65	±	8,485
4	36,5	±	2,121	17,65	±	0,354	56	±	11,314
5	36	±	2,828	17,1	±	0,849	52	±	16,971
6	35	±	4,243	16,5	±	0,707	49,3	±	4,950
7	33	±	0,000	15,8	±	0,566	45,5	±	8,485
8	28	±	4,243	14,25	±	1,061	32	±	1,414
9	20	±	4,243	10,1	±	0,071	30,7	±	4,950
10	12	±	2,828	8,4	±	0,283	28	±	4,243
11	11	±	0,000	7,8	±	0,212	22,5	±	0,707
12	7.5	±	0.707	5.9	±	0.141	18.1	±	2.828

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL DE FAENAMIENTO PORCINO

13	4	±	2,828	3,6	±	0,707	16,81	±	3,536
----	---	---	-------	-----	---	-------	-------	---	-------

ANEXO 4

FAME obtenidos en consorcio microalgal en agua residual de Faenamiento Porcino. Usando los tres mejores solventes respectivamente.

Proceso	Biomasa	Catalizador	Cl. Metanol (1:2)	Hexano	Acet. Etilo	Metilciclohexano	Etanol	Metanol
FAME Indirecto	Biomasa Seca	Ácido Sulfúrico	19,55 ± 0,0006			11,75 ± 0,0022		10,25 ± 0,0001
		Resina	1,45 ± 0,0012			1,8 ± 0,0008		1,3 ± 0,0007
		Ácido Sulfúrico		7,35 ± 0,0022		9,45 ± 0,0013	10,15 ± 0,0008	
	Biomasa Húmeda	Resina		22,4 ± 0,0291		4,6 ± 0,0004	8,4 ± 0,0082	
		Ácido Sulfúrico	92,9 ± 0,0078	95,65 ± 0,0045	87,5 ± 0,0059	91,55 ± 0,0066	90,8 ± 0,0064	91,8 ± 0,0033
		Resina	12,9 ± 0,0082	4,4 ± 0,0001	1,70 ± 0,0006	5,9 ± 0,0001	1,75 ± 0,0015	2,05 ± 0,00007
FAME AGL	Biomasa Seca	Resina						
FAME Directo	Biomasa Seca	Ácido Sulfúrico				28,92 ± 0,0019		
		Resina				15,62 ± 0,0026		