



ECUADOR UNIVERSIDAD
INTERNACIONAL
SEK
SER MEJORES

FACULTAD DE INGENIERIAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN
AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO”**

Realizado por:

KEVIN FERNANDO HERRERA RENJIFO

Director del proyecto:

PhD (c) Johanna Medrano Barboza

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 12 de marzo del 2021

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA
RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO**

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA
RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO
DECLARATORIA JURAMENTADA**

Yo, KEVIN FERNANDO HERRERA RENJOFO, con cédula de identidad #1718269473, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

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



Firma

1718269473

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA
RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN
AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO”**

Realizado por:

KEVIN FERNANDO HERRERA RENJIFO

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO 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 CULTIVADA EN AGUA
RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO
LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los Profesores Informantes:

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

RODOLFO JEFFERSON RUBIO AGUILAR

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



FIRMA



FIRMA

Quito, 12 de Marzo de 2021

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

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

Eficiencia Energética y Energías Renovables

Perteneciente a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada para:

Mis padres Fernando Herrera y Yolanda Renjifo quienes con amor, esfuerzo y trabajo me han permitido llegar a cumplir este sueño de culminar mis estudios y darme una oportunidad de ser una persona productiva para esta sociedad, gracias por inculcarme buenos valores y principios, para no temer a las dificultades que nos da la vida.

Mi hermano Jean Pierre Herrera por su apoyo incondicional, y estar siempre presente durante toda esta etapa, muchas gracias. Y agradezco a todos mis compañeros, profesores y amigos más cercanos que me han dado su apoyo.

A mis amigos Juan González, Paula Encalada y Javier Oleas que con mucho cariño me apoyaron en momentos difíciles, muchas gracias, sin ustedes este proceso hubiese sido más difícil.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más grande agradecimiento a todos los docentes y autoridades de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas que han estado en todo el proceso de aprendizaje que he tenido, por todos los conocimientos enseñados que me hicieron crecer como profesional.

A los profesores Johanna Medrano y José Rubén Ramírez que con mucha paciencia y esfuerzo colaborador me guiaron durante todo este proceso educativo. Principalmente quiero agradecer a la Dra. Johanna Medrano quien, con su colaboración, y enseñanzas permitió el progreso de esta tesis.

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA
RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO**

Para someter a:

To be submitted:

**Kevin Fernando Herrera Renjifo¹, Johanna Medrano Barboza^{1*}, José Rubén
Ramírez Iglesias, Rodolfo Jefferson Rubio Aguilar**

**“OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN
AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO”**

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador. 13/02/2021

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

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

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

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

RESUMEN

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos con altos contenidos de lípidos, capaces de degradar nutrientes de aguas residuales. En esta investigación se cultivó biomasa microalgal de *Scenedesmus sp.* y *Chlorella vulgaris* en agua residual de faenamiento porcino previamente esterilizada; los cultivos se realizaron en fotobiorreactores planos expuestos a las condiciones atmosféricas de Quito. Se midió crecimiento celular, los parámetros fisicoquímicos del cultivo y la obtención de biomasa y lípidos. Se caracterizaron los lípidos totales en forma de ácidos grasos libres (AGL) y ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs por sus siglas en Inglés) para determinar su posible uso en la producción de biocombustibles. Los resultados indican un crecimiento de biomasa superior para *Scenedesmus sp.* en comparación con *Chlorella vulgaris* (0,41 g/L vs 0,2 g/L), también se demostró que estas especies pueden emplearse en procesos de biorremediación debido a los porcentajes de remoción de nutrientes alcanzados (70,67% de NT, 60,91% de PT y 67,12% de CT para *Scenedesmus sp.* y 87,89% NT, 61,92% de PT y 77,08% de CT para *Chlorella vulgaris*). De los seis solventes extractores de lípidos probados solo metilciclohexano, cloroformo: metanol (1:2) y acetato de etilo presentaron buenos rendimientos de lípidos y AGL. Los porcentajes de FAMEs a partir de AGL estuvieron en el rango de 52,5% a 89,5% para *Scenedesmus sp.*, y para *Chlorella vulgaris* de 51% a 80,5% en peso. Aunque los valores de lípidos, AGL y FAMEs se encuentran por debajo del rango reportado por otros autores, no se descarta el uso de este medio cultivo en particular para la obtención de lípidos con miras a la producción de biocombustibles a partir de estas dos especies de microalgas.

Palabras clave: *Scenedesmus sp.*, *Chlorella vulgaris*, agua residual, faenamiento porcino, AGL, FAMEs.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microorganisms with high lipid content, capable of degrading nutrients from wastewater. In this research, microalgal biomass from *Scenedesmus sp.* and *Chlorella vulgaris* in wastewater from pig slaughter previously sterilized was cultivated in flat photobioreactors exposed to the atmospheric conditions in Quito. Cell growth and physicochemical parameters of the cultivation were measured, previous biomass culturing and lipid extraction. Total lipids were characterized in form of free fatty acids (FFA) and fatty acid methyl esters (FAMES) to determine their possible use in the production of biofuels. The results indicated a higher biomass growth for *Scenedesmus sp.* compared to *Chlorella vulgaris* (0.41 g / L vs 0.2 g / L), it was also shown that these species can be used in bioremediation processes due to the percentages of nutrient removal achieved (70.67% of TN, 60.91% of TP and 67.12% of TC for *Scenedesmus sp.* and 87.89% TN, 61.92% of TP and 77.08% of TC for *Chlorella vulgaris*). Of the six lipid extracting solvents tested, only methylcyclohexane, chloroform: methanol (1: 2), and ethyl acetate had better yields of lipids and FFA. The percentages of FAMES from FFA were in the range of 52.5% to 89.5% for *Scenedesmus sp.*, and for *Chlorella vulgaris* from 51% to 80.5% by weight. Although the values of lipids, FFA and FAMES are below of the range reported by other authors, the use of this type of wastewater as culture medium for the two microalgae species, cannot be ruled out for lipid extraction in biofuel production.

Keywords: *Scenedesmus sp.*, *Chlorella vulgaris*, wastewater, pig slaughter, FFA, FAMES.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la reducción de las reservas de petróleo y el aumento de la emisión de CO₂ son problemas que están relacionados con el consumo de combustibles fósiles. El 80% de producción de energía del mundo se obtiene mediante fuentes no renovables como el petróleo (Edenhofer *et al.*, 2011). Ante esta realidad; se han buscado nuevas fuentes de energía como los biocombustibles, que son energías renovables que se obtienen a partir de una gran variedad de biomasa o productos de origen vegetal o animal, su combustión genera 50% menos emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera y sustituye una parte del consumo de combustibles fósiles para transporte o energía (Fernández *et al.*, 2012; Serna *et al.*, 2011);

Los biocombustibles se agrupan dependiendo el tipo biomasa de donde provienen: los de primera generación provienen de plantas aprovechadas para alimentación que contienen altos contenidos de azúcares y grasas o aceites (Alejos & Calvo, 2016). Los de segunda generación son residuos con un alto contenido de celulosa y lignina, también los aceites de cocina usados (Faba *et al.*, 2014). Los de tercera generación son organismos capaces de alimentarse a partir de luz y CO₂, como algas, microalgas, hongos y levaduras, los cuales poseen un alto contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos (Armas Martínez *et al.*, 2019). Los de cuarta generación son organismos genéticamente modificados permitiendo a dichos organismos tener una mayor producción de azúcares o aceites y mayor captación de CO₂ (F. D. Ramos & Villar, 2016).

Las microalgas, son organismos unicelulares fotosintéticos con crecimiento autótrofo o heterótrofo que transforman el CO₂ de la atmosfera, luz y nutrientes en oxígeno y aceites vegetales (Cobos *et al.*, 2012; Fernandez, 2014). Fijan el CO₂ minimizando la contaminación de la atmósfera, reducen la carga orgánica e inorgánica de aguas contaminadas y se adaptan a distintos ecosistemas (A. González, 2015). Tienen la

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

capacidad de producir 50 veces más biomasa que plantas (Fernández *et al.*, 2012; Makareviciene *et al.*, 2011), y producen 10 veces más litros de aceite por hectárea que la soja y la palma africana (Colorado *et al.*, 2013).

Las microalgas idóneas para la producción de biodiesel deben cumplir algunas condiciones como: alta tasa de crecimiento, ser capaces de adaptarse a variaciones del medio de cultivo o condiciones atmosféricas y buena capacidad para formar agregados o flóculos para una cosecha por sedimentación (Hernández & Labbé, 2014). Estas son las microalgas oleaginosas porque almacenan energía en forma de lípidos o triglicéridos; existen 30 especies de microalgas como el género *Ankistrodesmus sp.*, *Kirechneriella sp.*, *Palmella sp.*, *Eudorina elegans*, *Volvox sp.*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*, entre otros (Cobos *et al.*, 2012). *Chlorella vulgaris*. y *Scenedesmus sp.* son microalgas con un crecimiento celular acelerado, alta producción de proteínas, vitaminas, lípidos y son capaces de remediar aguas residuales removiendo los contaminantes del agua y han sido empleadas para la producción de biodiésel (Makareviciene *et al.*, 2011; L. Ramos, 2014).

Los cultivos de microalgas a gran escala usan grandes volúmenes de aguas naturales como lagos, lagunas y mares, con fuentes de luz solar, CO₂ atmosférico, nutrientes en el medio y energía para aireación, luminosidad y otros controles dependiendo del cultivo o la especie de microalga (A. González, 2016; Loera & Olguín, 2010). Sin embargo, existen limitaciones para su uso como la gran cantidad de agua que se utiliza en el medio de cultivo, problemas de ingeniería con control de temperatura, pH, aireación, control de espumas, reposición de nutriente, etc. en cultivos a gran escala (Fernández *et al.*, 2012). Otra limitación es la adición de nutrientes en forma de fertilizantes costosos destinados principalmente a la agricultura (Ortiz *et al.*, 2012). Actualmente se buscan alternativas más económicas de medios de cultivo que sean eficientes para la producción de biomasa;

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

entre ellas el uso de diferentes tipos de aguas residuales (urbana, industrial, ganadería, etc.) (Hernández & Labbé, 2014).

Tradicionalmente, la carne de cerdo es apreciada como fuente de proteínas en la alimentación; durante el faenamiento de los cerdos se generan aguas residuales que pueden ser fuente de contaminación de cuerpos de agua cuando no son tratadas en plantas de tratamiento de aguas residuales (García *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2016). Dicha agua posee vastas cantidades de nutrientes, que son compuestos orgánicos e inorgánicos como diversas formas de nitrógeno, fósforo y carbono que pueden aprovechar las microalgas para su crecimiento; por ello, se han usado como una alternativa de medio de cultivo para producción de biomasa microalgal (Mezzomo *et al.*, 2010).

El uso de esta agua residual como medio de cultivo para las microalgas tiene ventajas sobre los cultivos convencionales con agua dulce o potable, pues no usa fuentes naturales de aguas, disminuyen la carga contaminante de las aguas residuales, reducen las concentraciones de demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), patógenos, metales pesados, son capaces de disminuir la contaminación de aire al ser esenciales para el ciclo del carbono (Romero *et al.*, 2018; Hasan *et al.*, 2014) y sintetizan proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos para obtención de biocombustibles (Cheunbarn & Peerapornpisal, 2010).

En esta investigación, se propuso el cultivo de las especies comerciales *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* en agua residual de faenamiento de porcino haciendo uso de fotobiorreactores expuestos a las condiciones atmosféricas de Quito, para comprobar si esta agua residual proporciona el contenido de nutrientes necesarios para alcanzar un crecimiento óptimo de las microalgas con fines de obtención de lípidos para la potencial producción de biocombustibles.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

2. METODOLOGÍA

Preparación de inóculo

Las cepas de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* utilizadas en el estudio se obtuvieron del Banco Español de Algas y se mantuvieron en medio líquido Bold's Basal Medium (BBM); las réplicas se realizaron en proporción 1:10 y los inóculos se colocaron en botellas autoclavables de 1 L con conexiones de aireación continua de 4,2 L/min, en fotoperiodos de 12 horas a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a temperatura ambiente durante siete días previo a la siembra.

Preparación de medio de cultivo

Se recolectaron 100 L de agua residual de una granja de faenamiento porcino ubicada en la ciudad de Latacunga, Ecuador. Se esterilizó el agua residual en autoclave durante 30 minutos a $121,5 \text{ }^\circ\text{C}$ y se enfrió a temperatura ambiente. Las partículas sólidas se removieron con un filtro cilíndrico multicapas de forma similar a las investigaciones de (Qin *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

Siembra del inóculo en el fotobiorreactor

Se inoculó el cultivo de microalgas con una densidad celular de $2,5 \cdot 10^5 \text{ cel/ mL}$ para *Scenedesmus sp.* y $1,88 \cdot 10^5 \text{ cel/ mL}$ para *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor por lotes con control de alimentación de 60 L que contenía 27 L de agua residual previamente tratada y filtrada en relación 1:10. El fotobiorreactor se mantuvo expuesto en la intemperie bajo las condiciones atmosféricas de Quito durante el mes de noviembre del 2020 con aireación continua y control de temperatura $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 11 días sin reposición de nutrientes.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

Determinación de crecimiento de microalgas

Se recolectaron 50 mL de muestras diariamente del fotobiorreactor durante 11 días; el crecimiento de los cultivos se determinó mediante espectrofotometría, conteo celular y peso seco. La espectrofotometría se realizó a 680 nm con un espectrofotómetro marca HACH 5000. El conteo celular se realizó mediante el recuento de las células visualizadas en la cámara de Neubauer en un microscopio óptico marca Leica a 40X y se determinó mediante la Ec (1) (Bastidas, 2011). El peso seco se realizó mediante la utilización de filtros de papel para análisis cualitativos con secado a 60 °C durante 24 h análogamente a la investigación de (Chia *et al.*, 2013). La productividad total se determinó mediante la EC (2) donde la biomasa total es la suma biomasa seca y húmeda obtenida, el volumen total del cultivo y el tiempo total del cultivo.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \cdot 10,000}{\text{número de cuadros} \cdot \text{dilución}} \left[\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right] \quad \text{Ec. (1)}$$

$$\text{Productividad total} = \frac{\text{biomasa total}}{\text{volumen} \cdot \text{tiempo}} \left[\frac{\text{g}}{\text{L d}} \right] \quad \text{Ec (2)}$$

Determinación de parámetros fisicoquímicos (NT, CT, PT)

Las muestras recogidas diariamente fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 5 min; y el sobrenadante se recolectó para el análisis por triplicado de los parámetros fisicoquímicos del cultivo. Se utilizaron protocolos HACH para la determinación de los nutrientes como nitrógeno total NT (mg/L N), fósforo total PT (mg/L PO₄³⁻) y carbono total CT (mg/L C) análogos al método 1072 (HACH, 2014a), 10127 (HACH, 2014c) y 10128 (HACH, 2014b), respectivamente.

Cosecha y obtención de biomasa microalgal

Una vez alcanzada la fase estacionaria a los 11 días de producción de biomasa, el fotobiorreactor se vació y su contenido se centrifugó a 4500 rpm por 5 min en tubos falcon

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

de 50 mL para recuperar la biomasa. La biomasa húmeda se llevó a refrigeración de -4 °C similar a la metodología de (Huamán, 2011). La obtención de biomasa seca se realizó con la ayuda de una estufa de convección forzada durante 5 h a 105 °C. Las biomásas húmedas y secas se guardaron para análisis posteriores.

Extracción de lípidos

La extracción de lípidos totales presentes en la biomasa húmeda y seca, se extrajeron con seis solventes orgánicos de alta pureza (grado HPLC): hexano, metanol, cloroformo: metanol (1:2), etanol, acetato de etilo y metilciclohexano. Se determinaron análogamente al método de Blingh & Dyer modificado por IMARPE (Salazar, 2012). La expresión de los resultados de lípidos se determinó mediante la Ec (3) donde, Tubo 1 es el peso del tubo colector vacío (g), Tubo 2 es el peso del tubo colector con la extracción de lípidos seco (g) y el peso seco es la masa de la biomasa de microalga húmeda o seca usada para la extracción (g). La productividad lípidos se determinó mediante la Ec (4) donde la masa total lípidos es la masa de lípidos secos, el volumen total del cultivo y el tiempo total del cultivo.

$$\% \text{ lípidos} = \frac{\text{Tubo2}-\text{Tubo1}}{\text{Peso seco}} * 100 \quad \text{Ec (3)}$$

$$\text{Productividad total} = \frac{\text{masa total de lípidos}}{\text{volumen} * \text{tiempo}} \left[\frac{g}{L d} \right] \quad \text{Ec (4)}$$

Extracción de Ácidos Grasos Libres (AGL)

La extracción de Ácidos Grasos Libres totales presentes en la biomasa seca, consistió en la saponificación de biomasa con solventes orgánicos y catalizador básico (KOH) determinados mediante el protocolo de extracción de AGL de (Dejode *et al.*, 2013). La expresión de los resultados de AGL se determinó mediante la Ec (5) donde

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

Tubo 1 es el peso del tubo colector vacío (g), Tubo 2 es el peso del tubo colector con la extracción de AGL seca (g) y el peso seco es la masa de la microalga seca usada (g).

$$\% AGL = \frac{Tubo2 - Tubo1}{Peso\ seco} * 100 \quad Ec (5)$$

Extracción de Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos (Fatty acid methyl esthers-FAMEs)

La extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos -FAMEs por sus siglas en Inglés- presentes en la biomasa seca y las grasas obtenidas en la extracción de lípidos y AGL, se determinaron en tres procesos:

- Proceso directo: a partir de la biomasa seca y catalizador
- Proceso indirecto: a partir de los lípidos obtenidos a partir de biomasa húmeda y seca y catalizador
- Proceso de AGL: a partir de los ácidos grasos libres y catalizador.

Para todos los casos se estudió la extracción de **FAMEs** con un catalizador ácido homogéneo (H₂SO₄) y un catalizador ácido heterogéneo (Resina comercial CT-269DR); con el siguiente procedimiento: por triplicado, para el catalizador homogéneo, se colocó dentro de cada reactor de vidrio una relación de (catalizador: solvente: biomasa o grasa) de (1,74:15:1); mientras que para el catalizador heterogéneo la relación fue de (1,1:70:1). Se colocó en baño térmico a 90 °C por 4 horas a 900 rpm. Al terminar la reacción, la fase orgánica se filtró en un equipo Millipore y se agregaron 2 mL al filtrado de una mezcla hexano: dietiléter (80:20) para eliminar impurezas de catalizador. Luego se pasó a un embudo de decantación, se agitó y dejó reposar por 10 min para alcanzar la separación de fases. Finalmente se trasvasó la fase orgánica a un tubo Falcon previamente pesado y se dejó secar a 60 °C por 24 h. Se pesó el recipiente con el producto seco, de acuerdo al protocolo de (Narváez *et al.*, 2004; Sánchez-Bayo *et al.*, 2020). La expresión de los

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

resultados de FAMES se determinó mediante la Ec (6) donde Tubo 1 es el peso del tubo colector vacío (g), Tubo 2 es el peso del tubo colector con la extracción de FAMES seca (g) y el peso seco es la masa de la microalga seca usada (g).

$$\% FAMES = \frac{Tubo2 - Tubo1}{Peso\ seco} * 100 \quad Ec (6)$$

Análisis estadísticos

Todos los valores de concentración celular, absorbancia, remoción de nutrientes (NT, PT y CT) fueron realizados por triplicado y se expresaron con valores de desviación estándar ($X \pm DE$); se realizó una comparación de medias de los diferentes parámetros a través de la prueba Kruskal Wallis, empleando el programa Statgraphics versión 18. Las diferencias entre medidas significativas se dan cuando ($p < 0,05$).

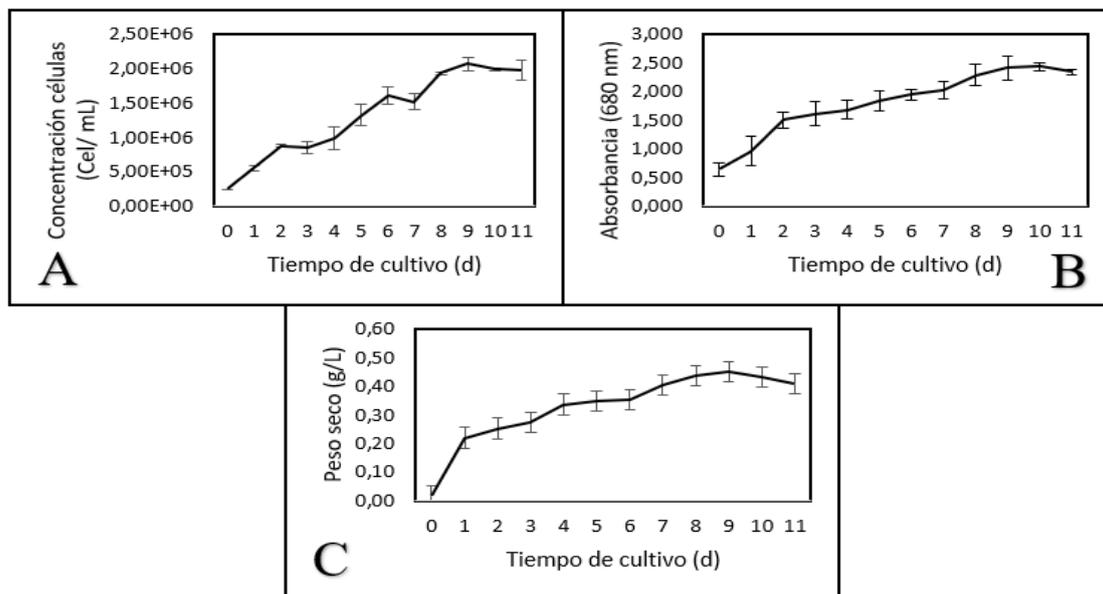
3. RESULTADOS

Crecimiento celular

En la figura 1 se observa el crecimiento de *Scenedesmus sp.* en agua de faenamiento porcino durante 11 días de cultivo. En la figura 1A se muestra la concentración celular del cultivo, cuyo valor inicial fue de $2,5 * 10^5$ cel/mL ± 0 y en el día 11 alcanzó la fase estacionaria con $1,98 * 10^6$ cel/mL $\pm 1,4 * 10^5$. En la figura 1B se muestra la curva de absorbancia del cultivo medida a 680 nm; presentando un valor inicial de $0,648 \pm 0,11$ y finalizando con un valor de $2,352 \pm 0,04$ al cabo de los 11 días de cultivo. En la figura 1C se muestra la curva de peso seco de *Scenedesmus sp.* con un valor inicial de $0,2$ g/L y finalizando en el día 11 con $0,41$ g/L.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

Figura 1: Crecimiento celular de *Scenedesmus* sp. cultivada en agua de faenamiento porcino durante 11 días de cultivo. A) Conteo celular (cel/mL vs tiempo), B) Absorbancia a una longitud de onda de 680 nm (Absorbancia vs tiempo) y C) Peso seco (g/L vs tiempo).

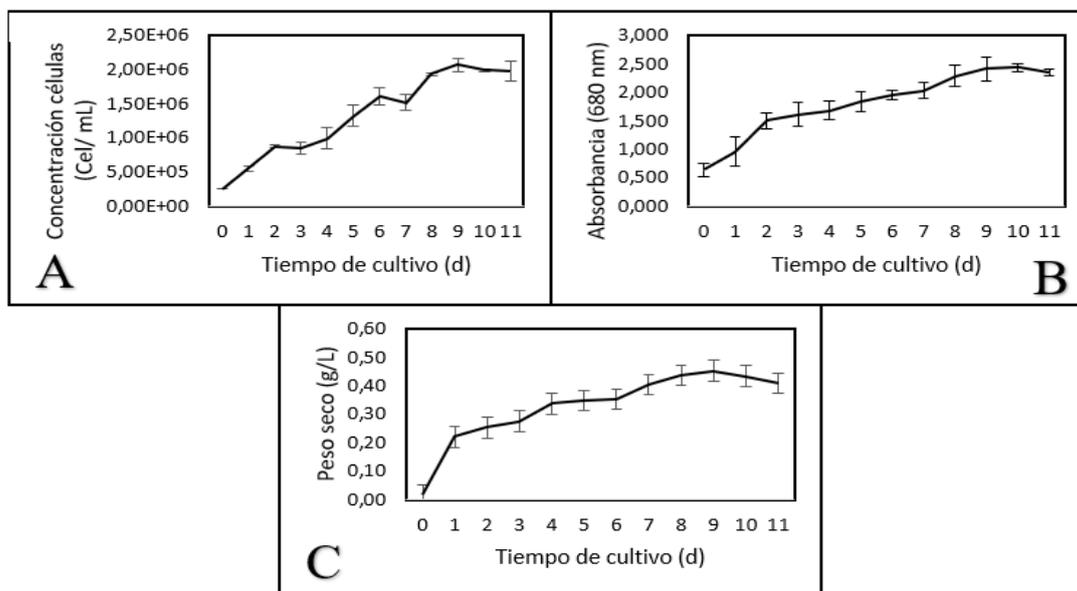


En la figura 2 se observa el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en agua de faenamiento porcino durante 11 días de cultivo. En la figura 2A se muestra la concentración celular del cultivo, cuyo valor inicial fue de $1,88 \cdot 10^5$ cel/mL ± 0 y en el día 11 alcanzó la fase estacionaria con $4,58 \cdot 10^6$ cel/mL $\pm 3,8 \cdot 10^4$. En la figura 2B se muestra la curva de absorbancia del cultivo medida a 680 nm; presentando un valor inicial de $0,229 \pm 0,02$ y finalizando con un valor de $2,168 \pm 0,008$ al cabo de los 11 días de

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

cultivo. En la figura 2C se muestra la curva de peso seco de *Chlorella vulgaris* con un valor inicial de 0,04 g/L y finalizando en el día 11 con 0,2 g/L.

Figura 2: Crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua de faenamiento porcino durante 11 días de cultivo. A) Conteo celular (cel/mL vs tiempo), B) Absorbancia a una longitud de onda de 680 nm (Absorbancia vs tiempo) y C) Peso seco (g/L vs tiempo).



Con las condiciones de cultivo se obtuvo 12,2813 g de biomasa húmeda, 14,3181 g seca de biomasa de *Scenedesmus sp.* y 12,1822 g de biomasa húmeda y 12,6424 g de biomasa seca de biomasa de *Chlorella vulgaris*. La productividad de la biomasa cultivada para *Scenedesmus sp* fue de 0,0895 g/ L d y *Chlorella vulgaris* fue de 0,0835 g/ L d.

Remoción de nutrientes

En la tabla 1 se muestran los valores iniciales de los nutrientes analizados para el agua residual de faenamiento porcino para el cultivo de *Scenedesmus sp.*: nitrógeno total, fósforo total y carbono total En la figura 3 se observan los parámetros fisicoquímicos (NT, PT, CT) del agua residual de faenamiento porcino durante los 11 días de cultivo de *Scenedesmus sp.* En la figura 3A el valor inicial de nitrógeno total del medio de cultivo fue de 70,5 g/L N \pm 7,12, finalizando en el día 11 con un valor de 22 g/L N \pm 3,41. Al comparar el contenido de NT del medio de cultivo previo la inoculación (tabla 1) vs el

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

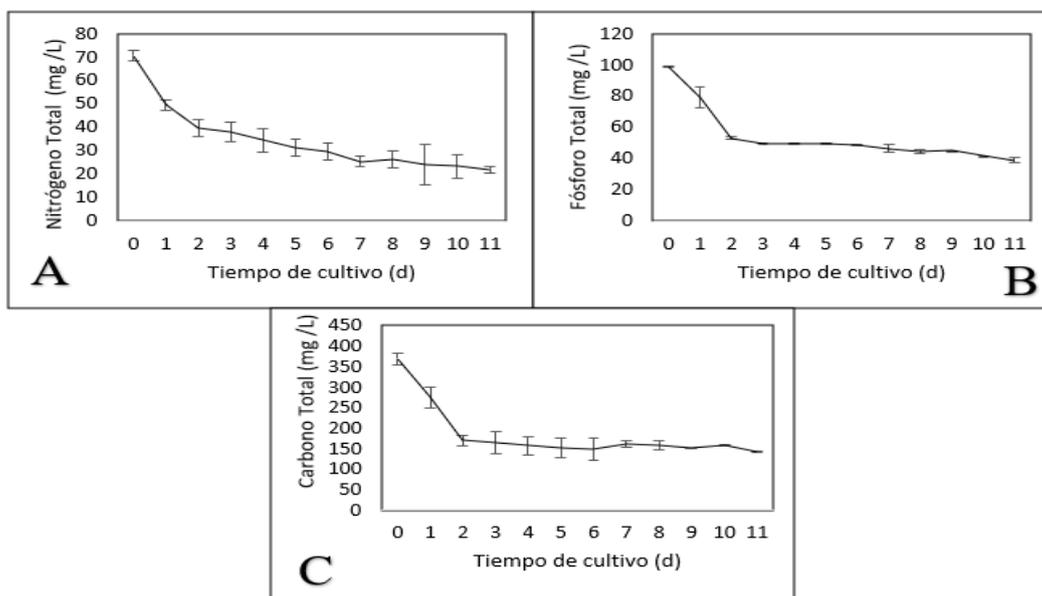
contenido de NT al día 11 se obtuvo una remoción equivalente al 70,67%. En la figura 3B se muestra el valor inicial de fósforo total del medio de cultivo el cual fue 98,45 mg/L $\text{PO}_4^{3-} \pm 2,35$ y finalizando en el día 11 con un valor de 39,05 mg/L $\text{PO}_4^{3-} \pm 3,61$. Comparando el contenido de PT del medio de cultivo previo la inoculación (tabla 1) vs el contenido de PT al día 11 se obtuvo una remoción equivalente al 60,91%. En la figura 3C se observa que el valor inicial de carbono total del medio de cultivo en el día 0 fue de 98,45 mg/L C $\pm 71,84$, finalizando en el día 11 con un valor de 39,05 mg/L C $\pm 49,41$. Comparando el contenido de CT del medio de cultivo previo la inoculación (tabla 1) vs el contenido de CT al día 11 se obtuvo una remoción equivalente al 67,12 %.

Tabla 1: Parámetros fisicoquímicos del agua residual de faenamiento porcino previo a la inoculación de *Scenedesmus sp.*

Parámetros fisicoquímicos	Valor inicial
Nitrógeno total (mg/L N)	75
Fósforo total (mg/L PO_4^{3-})	99,9
Carbono total (mg/L C)	438

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

Figura 3: Remoción de nutrientes del agua de faenamiento porcino durante 11 días de cultivo con *Scenedesmus sp.* A) Nitrógeno total (mg/L N vs tiempo), B) Fósforo total (mg/L PO₄³⁻ vs tiempo) y C) Carbono Total (mg/L C vs tiempo):



En la tabla 2 se muestran los valores iniciales de los nutrientes analizados para el agua residual de faenamiento porcino: nitrógeno total, fósforo total y carbono total para el cultivo de *Chlorella vulgaris*. En la figura 4 se observan los parámetros fisicoquímicos (NT, PT, CT) del agua residual de faenamiento porcino durante los 11 días de cultivo de *Chlorella vulgaris*. En la figura 4A el valor inicial de nitrógeno total del medio de cultivo en el día 0 fue de 90,5 g/L N \pm 6,12 y finalizando en el día 11 con un valor de 11,5 g/L N \pm 3,53. Considerando el valor del NT del medio de cultivo previo a inoculación (tabla 2) y el contenido de NT al finalizar el cultivo en el día 11, la remoción de nitrógeno fue de 87,89%. En la figura 4B se muestra el valor inicial de fósforo total del medio de cultivo del día 0, el cual fue 49,55 mg/L PO₄³⁻ \pm 11,19 y finalizando en el día 11 con un valor de 22,85 mg/L PO₄³⁻ \pm 3,35. Considerando el valor del PT del medio de cultivo previo a inoculación (tabla 2) y el contenido de PT al finalizar el cultivo en el día 11, la remoción de fósforo fue de 61,92%. En la figura 4C se observa que el valor inicial al día 0 de carbono total del medio fue de 371 mg/L C \pm 51,72, finalizando en el día 11 con un valor

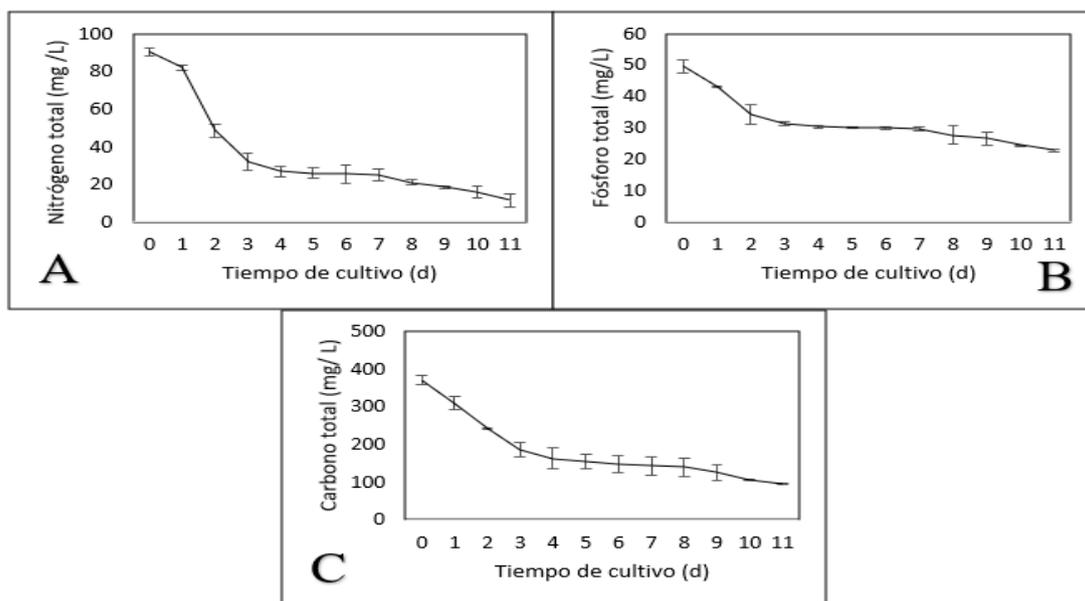
OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

de 96,5 mg/L C \pm 6,12, que representa una remoción del contenido de carbono total de 77,08 %, al comparar con el valor inicial de CT del medio de cultivo previo a inoculación (tabla 2)

Tabla 2: Parámetros fisicoquímicos del agua residual de faenamiento porcino previo a la inoculación de *Chlorella vulgaris*.

Parámetros fisicoquímicos	Valor inicial
Nitrógeno total (mg/L N)	95
Fósforo total (mg/L PO ₄ ³⁻)	60
Carbono total (mg/L C)	421

Figura 4: Remoción de nutrientes del agua de faenamiento porcino durante 11 días de cultivo con *Chlorella vulgaris*. A) Nitrógeno total (mg/L N vs tiempo), B) Fósforo total (mg/L PO₄³⁻ vs tiempo) y C) Carbono Total (mg/L C vs tiempo).



Los valores de concentración celular, absorbancia y parámetros fisicoquímicos encontrados en este estudio se hicieron por triplicado, encontrando diferencias

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

significativas entre el día 0 y el día 11 de cultivo; lo cual demuestra un cambio en los valores de dichas variables conforme al crecimiento de las microalgas.

En la tabla 3 se presentan los valores de NT, PT y CT al onceavo día de cultivo para las dos especies de microalgas estudiadas, y los límites permisibles para el agua de riego de uso agrícola y de descarga de alcantarillado expuestas en el 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 (TULSMA), con el propósito de observar una posible aplicación de biorremediación de aguas residuales

Tabla 3: Comparación de nutrientes removidos respecto de límites permisibles de NT, PT y CT en agua de uso de riego agrícola y agua de descarga al sistema de alcantarillado expuestos en el libro VI del TULSMA, Ecuador

Niveles de calidad de agua	Máximo permisible		
	Nutrientes		
	NT	PT	CT
Agua de faenamiento porcino tratada (<i>Scenedesmus sp</i>)	22 mg/ L	39,05 mg/ L	39,05 mg/ L
Agua de faenamiento porcino tratada (<i>Chlorella vulgaris</i>)	11,05 mg/ L	22,85 mg/ L	96,5 mg/ L
Descarga al sistema de alcantarillado público	60 mg/ L	15 mg/ L	No reporta
Agua de riego agrícola	5-30 mg/ L	No reporta	No reporta

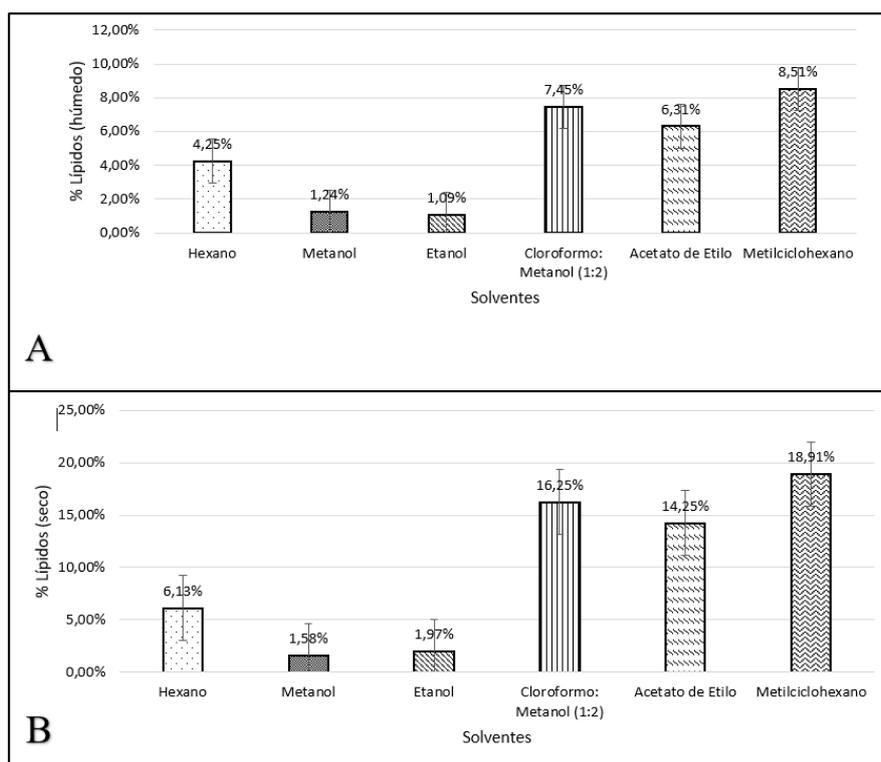
Determinación de Lípidos, AGL y FAMES:

En la figura 5 se observa el porcentaje de lípidos obtenidos a partir de biomasa seca y húmeda de *Scenedesmus sp.* con seis diferentes solventes orgánicos: hexano, metanol, etanol, cloroformo: metanol (1:2), acetato de etilo y metilciclohexano. En la extracción por vía húmeda y seca se observa que para ambos casos el mejor solvente extractor fue metilciclohexano con un valor de lípidos extraídos de 8,51% y una productividad de 0,000289 g/ L d para la biomasa húmeda, mientras que para la biomasa seca se obtuvo

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

18,91% de lípidos, con una productividad de 0,000318 g/ L d. El segundo mejor solvente extractor fue cloroformo: metanol (1:2) con 7,45% de lípidos y una productividad de 0,000255 g/ L d en húmedo, mientras que por la vía seca se obtuvo 16,25% de lípidos con una productividad de 0,000274 g/ L d. El tercer mejor solvente extractor fue acetato de etilo con porcentaje de lípidos extraídos de 6,31% y productividad de 0,000218 g/ L d en húmedo y 14,25% de lípidos con una productividad de 0,00024 g/ L d en seco. La cantidad de lípidos extraídos con etanol, metanol y hexano fue inferior a 5% en fase húmeda y 7% en fase seca, lo cual los califica como solventes orgánicos inefficientes para la extracción de lípidos de *Scenedesmus sp.*

Figura 5: Determinación de lípidos en *Scenedesmus sp.* A) Determinación de lípidos a partir de biomasa húmeda y B) Determinación de lípidos a partir de biomasa seca.

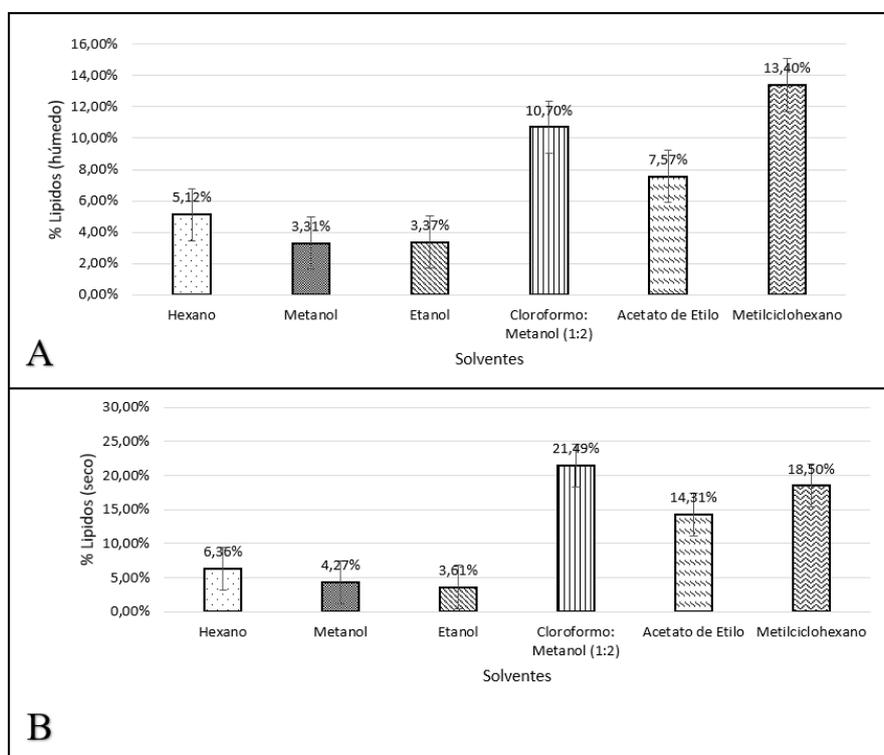


En la figura 6 se observa el porcentaje de lípidos obtenidos a partir de biomasa seca y húmeda de *Chlorella vulgaris* con seis diferentes solventes orgánicos: hexano, metanol, etanol, cloroformo: metanol (1:2), acetato de etilo y metilciclohexano. En la extracción

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

por vía húmeda se observa que el mejor solvente extractor fue metilciclohexano (13,40% de lípidos y productividad de 0,000463 g/ L d), y por vía seca fue cloroformo: metanol (21,49% de lípidos con una productividad de 0,000362 g/ L d). En segundo lugar, los mejores solventes extractores fueron cloroformo: metanol (1:2) (10,70% de lípidos con una productividad de 0,000363 g/ L d en húmedo) y metilciclohexano (18,50% de lípidos con una productividad de 0,000311 g/ L d en seco). El tercer mejor solvente extractor fue acetato de etilo con porcentaje de lípidos extraídos de 7,57% con una productividad de 0,000263 g/ L d en húmedo y 14,31% con una productividad de 0,000241 g/ L d en seco, respectivamente. La cantidad de lípidos extraídos con etanol, metanol y hexano fue inferior a 6% en fase húmeda y 7% en fase seca, lo cual los califica como solventes ineficientes para la extracción de lípidos de *Chlorella vulgaris*.

Figura 6: Determinación de lípidos en *Chlorella vulgaris* A) Determinación de lípidos a partir de biomasa húmeda y B) Determinación de lípidos a partir de biomasa seca.

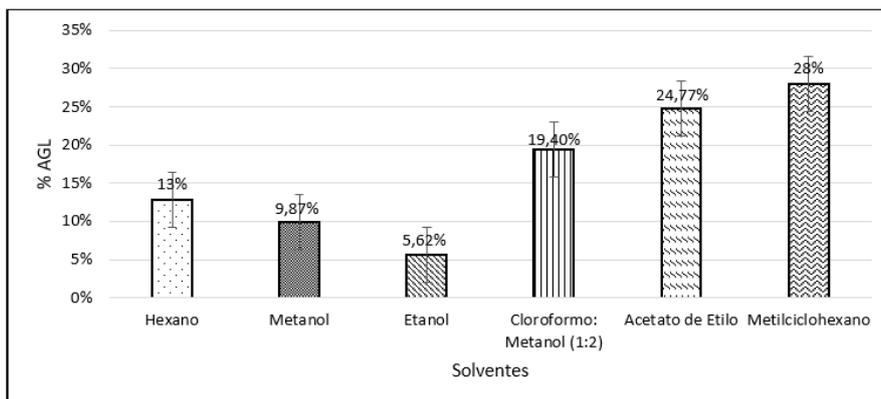


En la figura 7 se observa el porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) con biomasa seca de *Scenedesmus sp.* con seis diferentes solventes orgánicos: hexano, metanol, etanol,

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

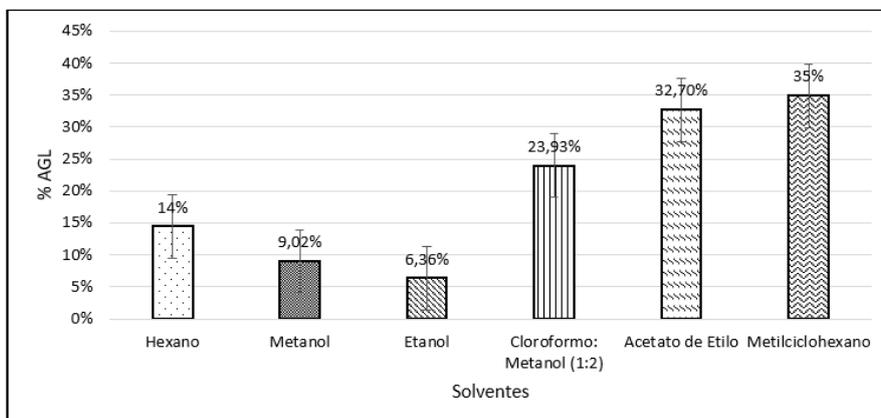
cloroformo: metanol (1:2), acetato de etilo y metilciclohexano. Los mejores solventes extractores de AGL fueron: metilciclohexano con 28%, acetato de etilo con 24,77% y cloroformo: metanol (1:2) con 19,40 %. Los solventes metanol, etanol y hexano extrajeron AGL en porcentajes menores al 14 %.

Figura 7: Determinación de ácidos grasos libres (AGL) en *Scenedesmus* sp.



En la figura 8 se observa el porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) con biomasa seca de *Chlorella vulgaris* con seis diferentes solventes orgánicos: hexano, metanol, etanol, cloroformo: metanol (1:2), acetato de etilo y metilciclohexano. Los mejores solventes extractores de AGL fueron: metilciclohexano con 35%, acetato de etilo con 32,70% y cloroformo: metanol (1:2) con 23,93 %. Los solventes metanol, etanol y hexano extrajeron AGL en porcentajes menores al 15 %.

Figura 8: Determinación de ácidos grasos libres (AGL) en *Chlorella vulgaris*.



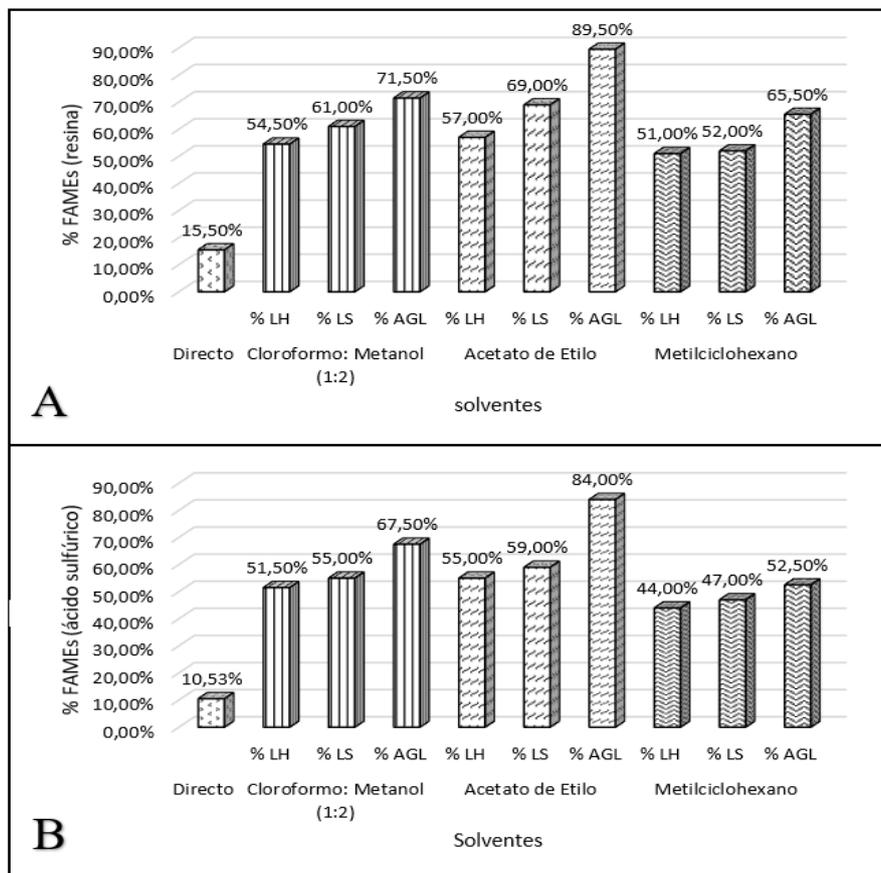
OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

En la figura 9 se observa el porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) obtenidos a partir de los tres mejores solventes extractores resultantes de la extracción de AGL; utilizando tres tipos de muestras: i) biomasa seca de *Scenedesmus sp.*, ii) lípidos extraídos a partir de biomasa húmeda y seca y iii) grasas de AGL; para todos los casos se empleó catalizadores ácidos. En la figura 9A se muestran los resultados obtenidos empleando la resina comercial CT-269, la cual es un catalizador ácido heterogéneo; puede apreciarse que los porcentajes de FAMEs a partir de AGL estuvieron en el rango de 65% hasta 90%, los FAMEs contenidos en los lípidos secos varían en un rango de 52% hasta 69%, mientras que en los lípidos extraídos a partir de biomasa húmeda se encontraron en el rango de 51% hasta 57%. Por su parte, para la biomasa seca directa el porcentaje de FAMEs fue 15,50% con el uso de la resina mencionada.

En la figura 9B se muestran los resultados obtenidos empleando un catalizador ácido homogéneo como el ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4); puede apreciarse que los porcentajes de FAMEs a partir de AGL estuvieron en el rango de 52% hasta 84%, los FAMEs contenidos en los lípidos secos varían en un rango de 47% hasta 59%, mientras que en los lípidos extraídos a partir de biomasa húmeda se encontraron en el rango de 44% hasta 55%. Para la biomasa seca directa el porcentaje de FAMEs fue 10,53% con el uso del ácido.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

Figura 9: Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) en *Scenedesmus* sp.

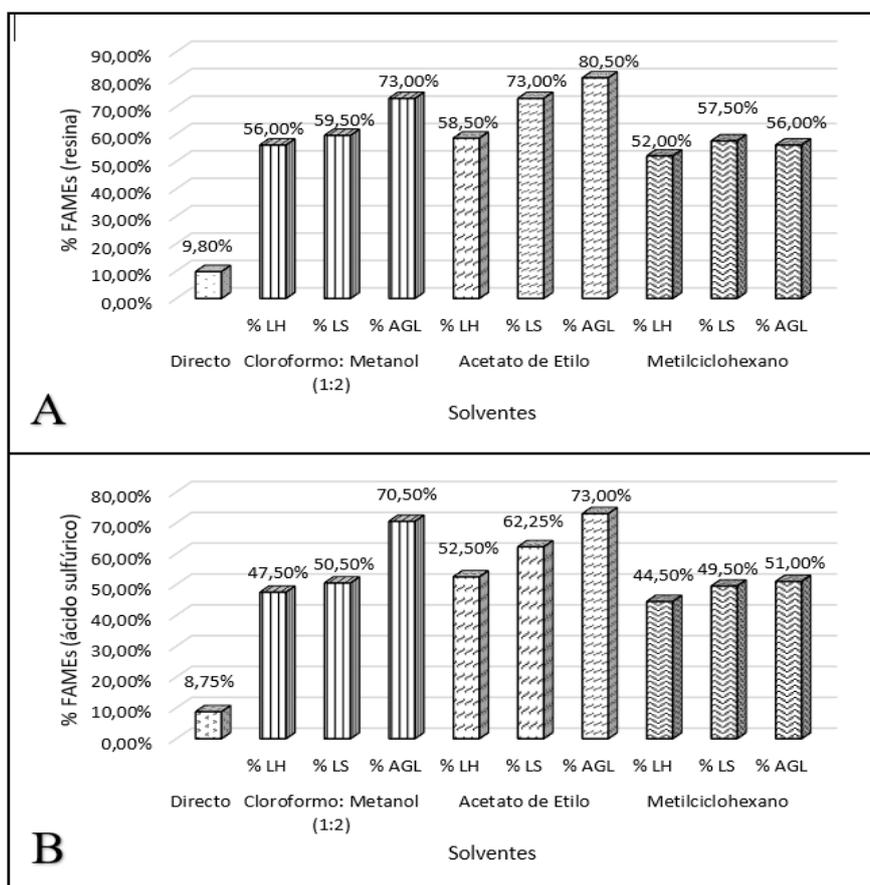


En la figura 10 se observa el porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) obtenidos a partir de los tres mejores solventes extractores; utilizando biomasa seca de *Chlorella vulgaris*., muestras de lípidos extraídos a partir de biomasa húmeda y seca y muestras de AGL empleando catalizadores ácidos. En la figura 10A se muestran los resultados obtenidos empleando la resina comercial CT-269, la cual es un catalizador ácido heterogéneo; puede apreciarse que los porcentajes de FAMEs a partir de AGL estuvieron en el rango de 56% hasta 80,50%, los FAMEs contenidos en los lípidos secos varían en un rango de 57% hasta 73%, mientras que en los lípidos extraídos a partir de biomasa húmeda se encontraron en el rango de 52% hasta 58,50%. Por su parte, para la biomasa seca directa el porcentaje de FAMEs fue 9,80% con el uso de la resina mencionada.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

En la figura 10B se muestran los resultados obtenidos empleando un catalizador ácido homogéneo como el ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄); puede apreciarse que los porcentajes de FAMES a partir de AGL estuvieron en el rango de 51% hasta 73%, los FAMES contenidos en los lípidos secos varían en un rango de 49% hasta 62%, mientras que en los lípidos extraídos a partir de biomasa húmeda se encontraron en el rango de 44% hasta 52%. Para la biomasa seca directa el porcentaje de FAMES fue 8,75% con el uso del ácido.

Figura 10: Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) en *Chlorella vulgaris*



OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Crecimiento celular

En la figura 1A se observan los valores obtenidos para la especie *Scenedesmus sp.*, cultivada en agua de faenamiento porcino, apreciando que la concentración máxima de células se dio en el día 9 y posteriormente alcanzó su fase estacionaria en el día 11. En este estudio no se realizó dilución del medio de cultivo inicial para disminuir la carga orgánica y la turbidez del medio y así reducir los consumos de agua; además no se hizo reposición de nutrientes durante el tiempo de cultivo.

La concentración celular de *Scenedesmus sp.* fue menor a la concentración obtenida en el estudio de Kim *et al.* (2007), donde fue usado un medio de cultivo de agua residual de orina de cerdos fermentada, en el que se obtuvo una concentración máxima 10 veces mayor a la obtenida en este estudio; esto se puede atribuir a las diferencias en tiempo y condiciones de cultivo en el estudio de Kim *et al.* (2007) que fue de 60 días, incluyendo la adición de nutrientes en el día 12, condiciones que pudieron mejorar la producción de biomasa final.

En la figura 1B se puede observar que la absorbancia de esta investigación fue superior al estudio de Jia *et al.*, (2016), donde realizaron cultivos de bajo costo de *Scenedesmus sp.* con aguas residuales de porcinos filtradas y digeridas anaeróbicamente; esta diferencia en valores de absorbancia puede atribuirse a que los medios de cultivo de Jia *et al.*, (2016) tuvieron más nutrientes en el agua como el nitrógeno amoniacal, necesarios para el crecimiento celular; sin embargo, un incremento en la cantidad de amonio, puede inhibir el crecimiento celular por toxicidad (Jia *et al.*, 2016).

En la figura 1C se presenta la concentración en peso seco (g/ L) obtenida luego de los 11 días de cultivo, dicho valor es mayor en comparación con el estudio de Cheng *et*

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

al., (2020), en el que determinaron los efectos de contaminantes refractarios de aguas residuales porcinas sobre *Scenedesmus sp.*, concluyendo que una concentración alta de nitrógeno en forma de amonio pudo afectar a la microalga en su crecimiento.

El valor de productividad total de biomasa de *Scenedesmus sp* obtenida luego de los 11 días de cultivo, se encuentra dentro del intervalo en comparación con la investigación de Jia *et al.*, (2016); donde obtuvo una productividad de biomasa desde 0,07717 g/L d hasta 0,15 g/L d, utilizando aguas residuales porcinas digeridas y filtradas con distintas diluciones con de medio MSE. La productividad de esta investigación es superior en comparación a los estudios de Kim *et al.*, (2007), donde se usó orina fermentada como medio de cultivo obteniendo una productividad de 0,006 g/ L día y Sacristán de Alva *et al.*, (2013), donde se usó aguas residuales municipales como medio de cultivo encontrando un valor de productividad de 0,0737 g/ L d.

Los valores obtenidos en crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* en la figura 2A muestran que la concentración máxima de células se dio en el día 9 y alcanzan su fase estacionaria en el día 11. Dicha concentración celular es similar a las concentraciones del estudio de López-Pacheco *et al.*, (2019), donde combinaron el nejayote (agua residual del proceso de cocción del maíz) , aguas residuales porcinas y agua pura como medio para la producción y el tratamiento de aguas residuales de *Arthrospira maxima* y *Chlorella vulgaris*, con varios tratamientos; y en el tratamiento 5 emplearon 90% del agua residual porcina, donde se obtuvo una concentración de $1,481 \cdot 10^6$ cel/mL. En los otros tratamientos (1 al 4) las concentraciones celulares fueron superiores debido a la mezcla de agua pura con el agua residual, ya que disminuye la turbidez y la carga orgánica del medio de cultivo, aumentando el crecimiento celular de dichos tratamientos (López-Pacheco *et al.*, 2019).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

La figura 2B muestra que el valor máximo de absorbancia alcanzado por *Chlorella vulgaris* al cabo de los 11 días de cultivo fue de 2,168 a 680 nm; dicho valor es mayor a la absorbancia reportada Cao *et al.*, (2018), con un valor de 1,129 a 680 nm y pH de 6 luego de 12 días de cultivo. Esta diferencia puede atribuirse a cambios en el pH; estudios demuestran que mientras mayor sea el pH del medio de cultivo, mayor es la concentración celular. Normalmente con el uso de aguas residuales el pH tiende a aumentar en los días iniciales de cultivo debido al consumo de carbono inorgánico y la liberación de metabolitos en el cultivo durante la actividad fotosintética de las microalgas (C. González *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2014).

La figura 2C muestra que la concentración en peso seco para *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual de faenamiento porcino resultó menor a la observada por Wen *et al.*, (2017), quienes cultivaron la misma especie en aguas residuales porcinas diluidas con BG11, encontrando valores de peso seco de 0,78 g/L en el medio BG11 puro; 0,64 g/L para el tratamiento 20% de agua residual y 80% de BG11 y 0,5 g/L para el tratamiento de 40% de agua residual y 60% de BG11; lo cual muestra una mejora de los valores de peso seco cuando las aguas residuales se diluyen.

El valor de productividad total de biomasa de *Chlorella vulgaris* obtenida luego de los 11 días de cultivo, se encuentra por debajo del rango en comparación con la investigación de Qin *et al.*, (2014), donde se usó como medio de cultivo aguas residuales lácteas tratadas con cloro y luz UV, cuyo rango de productividad obtenido fue desde 0,198 g/L d hasta 0,441 g/L d. La productividad de esta investigación es superior en comparación al estudio de Han *et al.*, (2014), donde se tuvo una productividad de 0,0286 g/ L d.

Las microalgas usadas en este estudio se diferencian por las concentraciones de biomasa obtenidas, *Chlorella vulgaris* tuvo mayor concentración en absorbancia y conteo

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

celular en comparación con *Scenedesmus sp.*, especie que tuvo un mayor valor en peso seco y por lo tanto, una mayor cantidad de biomasa total (Arredondo-Vega & Voltolina, 2017). Otras investigaciones afirman que la absorbancia incrementa en especies de microalgas que acumulan clorofila como la *Spirulina platensis* gracias a la disponibilidad de nitrógeno en el medio (Dalva Godoy *et al.*, 2011); pero altas concentraciones de amonio en el medio de cultivo también provocan problemas en el crecimiento celular, lo cual puede explicar bajas concentraciones de peso seco (Cheng *et al.*, 2020). Las diferencias de productividad de biomasa se deben a las distintas concentraciones de oligoelementos, materia orgánica que ayudan al crecimiento; mientras que los agentes inhibidores y el aumento de pH que puede afectar su crecimiento celular (Jia *et al.*, 2016; Sacristán de Alva *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2014).

Remoción de nutrientes

En las figuras 3 y 4 se observa la remoción de nutrientes del medio de cultivo conforme el crecimiento de las especies de microalgas analizadas en este estudio. La remoción de nitrógeno total en *Scenedesmus sp.* fue de 70,67%; a diferencia de *Chlorella vulgaris* fue de 87,89%; lo cual se encuentra en un rango menor de remoción en comparación con el estudio de Makareviciene *et al.*, (2011), en el que emplearon medio BBM con concentraciones diferentes de fuentes de nitrógeno alcanzando remociones superiores al 90% de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* al cabo de 20 días de cultivo.

En el estudio actual, el fósforo total removido por ambas especies de microalgas fue similar (60,91% y 61,92% para *Scenedesmus sp.* y *Chlorella vulgaris*, respectivamente), valores que se acercan a los resultados de Hasan *et al.*, (2014) donde la remoción fue de 74,3% hasta 92,5% para *Chlorella vulgaris* cultivadas en aguas residuales porcinas. Para la especie *Scenedesmus sp.* Jia *et al.*, (2016) reportan remoción de fósforo de 53% hasta 88,7%; equivalente a la remoción de este estudio.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

La remoción de carbono total de *Chlorella vulgaris* del actual estudio fue de 77,08%; un valor mayor a los resultados de Wen *et al.*, (2017), en aguas residuales porcinas diluidas con BG11 cuya remoción fue de 58,03%; esto se debe a que existen compuestos de carbono que la microalga no usa para su crecimiento. En *Scenedesmus sp.* se obtuvo una remoción menor al estudio de Veuthey & Grima, (2015), donde se usó agua residual de los purines de cerdo obteniendo un rango de remoción de 69% a 99% de CT, que difieren del valor obtenido en este estudio de 67,12%. Al igual que la especie anterior, el aprovechamiento del carbono dependerá de las formas disponibles (orgánicas e inorgánicas), y la asimilación de dichas formas de carbono por las microalgas.

Considerando la normativa ambiental ecuatoriana, se compararon los resultados de NT, PT y CT del agua residual de faenamiento porcino luego de los 11 días de cultivo con los niveles de calidad expuestos para aguas de descarga al sistema de alcantarillado y de riego agrícola, observando que el NT de esta investigación en comparación a estas aguas de referencia se encuentra por debajo del límite permisivo; el PT en comparación para la descarga al sistema de alcantarillado se encuentra por encima del límite permisivo y en aguas de riego agrícola no reporta un máximo permisible. El CT no se reporta para estos tipos de agua.

Aun cuando el agua residual tratada con microalgas cumple el parámetro de NT para uso en riego agrícola, no podría ser usada para tal fin puesto que existen otros parámetros fisicoquímicos en el TULSMA que deben cumplirse (metales pesados, boro, coliformes fecales, aceites y grasas, sólidos disueltos totales, entre otros), y que no se determinaron en esta investigación. Para el caso de PT y CT no se reportan valores máximos permisibles para su uso en riego. Para el caso del agua de descargue en alcantarillado, la concentración de PT es superior a los límites reportados por lo cual esta agua no puede ser descargada a las alcantarillas; de manera análoga deben cumplirse otros parámetros fisicoquímicos no estudiados en esta investigación.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

Lípidos

En la figura 5, se observa la extracción de lípidos de *Scenedesmus sp.* con seis diferentes solventes; los valores más altos de lípidos extraídos en este estudio fueron con metilciclohexano en biomasa húmeda y seca (8,51% y 18,91%, respectivamente), los demás solventes presentaron valores menores de lípidos. En el estudio de Jia *et al.*, (2016), la extracción lipídica fue mayor con la misma especie; sus extracciones estuvieron en el rango de 24,83% hasta 31,66% empleando como solvente una mezcla de metanol-dimetilsulfóxido, éter dietílico y hexano (1:1:1, v/ v/v). Dichos resultados superiores pueden deberse al uso de un conjunto de solventes diferentes polaridades que mejoran la extracción de grasas.

La extracción de lípidos de *Scenedesmus sp.* en el estudio de Sacristán de Alva *et al.*, (2013) en agua residual municipal alcanzó extracciones en el rango de 12,7% hasta 28,3% con el solvente cloroformo: metanol (2:1); dichos valores se acercan a los obtenidos con el solvente cloroformo: metanol (1:2) en el actual estudio, los cuales fueron de 7,45% y 16,25%, de biomasa húmeda y seca respectivamente, siendo el segundo mejor solvente extractor para *Scenedesmus sp.* de esta investigación. Mientras que en el estudio de Di Caprio *et al.*, (2015), la extracción lipídica con cloroformo: metanol (1:2), estuvo en un rango de 17% a 24% para la misma especie utilizando los nutrientes de BG11 en agua potable como medio de cultivo.

La extracción de lípidos de *Scenedesmus sp.* cultivada en el medio TAP pH 6.8 del estudio de Melih *et al.*, (2016), que se realizó con hexano en el método Soxhlet, obteniendo una extracción de 9,3% de lípidos; dicho valor es comparable al porcentaje de extracción del solvente orgánico acetato de etilo para biomasa húmeda y seca (6,31% y 14,25%, respectivamente) de esta investigación, mientras que con hexano el porcentaje de extracción fue menor (biomasa húmeda de 4,45% y de biomasa seca de 6,13%).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

El valor obtenido de productividad total de lípidos secos y húmedos de *Scenedesmus sp.* con los tres mejores solventes orgánicos (metilciclohexano, cloroformo: metanol (1:2) y acetato de etilo), se encuentra por debajo del rango en comparación con las investigaciones de Jia *et al.*, (2016); donde obtuvo una productividad de lípidos en el rango desde 0,0198 g/ L d hasta 0,027 g/ L d, empleando una mezcla de metanol-dimetilsulfóxido, éter dietílico y hexano (1:1:1, v/ v/v); y Ma *et al.*, (2017), quienes obtuvieron una productividad en el intervalo desde 0,0637 g/ L d hasta 0,125 g/ L d, donde se usó agua residual de melaza diluida con medio BG11 empleando una mezcla de cloroformo: metanol (2:1).

En la figura 6, se observa la extracción de lípidos de *Chlorella vulgaris* con seis diferentes solventes; el estudio de Hasan *et al.*, (2014), muestra la extracción de lípidos a partir de biomasa seca con cloroformo: metanol (1:2) cuyo resultado fue de 15.2%; los valores obtenidos de extracción lipídica con el mismo solvente fueron de 10,70% en biomasa húmeda y 21,49% de biomasa seca en la actual investigación, estando en un rango de extracción de lípidos aceptables para la escala piloto e industrial con fines de obtención de biocombustibles (mayor al 20%); por lo cual se consideró a la mezcla cloroformo: metanol (1:2) como el mejor solvente extractor para esta especie.

En la extracción con metanol en el estudio de Qin *et al.*, (2014), para *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas residuales para la industria láctea, muestra una extracción lipídica de 14,38%; a diferencia de este estudio donde la extracción con el mismo solvente en biomasa húmeda y seca donde fue menor al 5%; lo cual, para las condiciones de este cultivo no es un porcentaje de extracción aceptable con fines de obtención de biocombustibles a gran escala.

Si bien no fue posible encontrar investigaciones de extracción de lípidos para solventes como el etanol y metilciclohexano para las dos microalgas estudiadas en esta

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

investigación, otros investigadores han trabajado con solventes similares a los de este trabajo; tal es el caso de los resultados obtenidos en el estudio de Sánchez-Bayo *et al.*, (2020), donde se realizó la extracción lipídica de *Isochrysis galbana* cultivada en aguas residuales municipales con acetato de etilo, cloroformo: metanol (1:2) y hexano, encontrando valores de lípidos de 7,5% para hexano, 38% para cloroformo: metanol (1:2) y 17,9% para acetato de etilo. En comparación con el trabajo anterior, los resultados del presente trabajo son menores para las extracciones de lípidos en biomasa húmeda y seca tanto para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.*, pudiendo estar asociadas tanto a las características de las especies, las condiciones de cultivo y nutrientes disponibles.

El valor obtenido de productividad total de lípidos secos y húmedos de *Chlorella vulgaris* con los tres mejores solventes orgánicos (metilciclohexano, cloroformo: metanol (1:2) y acetato de etilo), se encuentra por debajo del rango en comparación con las investigaciones de Qin *et al.*, (2014) donde se usó como medio de cultivo aguas residuales lácteas tratadas con cloro y luz UV, cuya productividad estuvo en el rango desde 0,027 g/L d hasta 0,051 g/L d, empleando hexano: éter (1:1); así como el estudio de Tejeda-Benítez *et al.*, (2015), el cual muestra que la productividad de *Chlorella sp.* fue de 0,0396 g/L d, usando medio de cultivo Conwy modificado y una mezcla de cloroformo: metanol (1:2).

El contenido lipídico de las microalgas dependerá del medio de cultivo que se usa, así como de factores externos que pueden afectar la producción de lípidos (Jia *et al.*, 2016). Las microalgas al tener estrés por falta de fuentes de nutrientes, en especial de nitrógeno en su fase estacionaria, pueden acumular un 15% más de lípidos (Sacristán de Alva *et al.*, 2013). La concentración de fósforo en el medio de cultivo también puede marcar una diferencia en la obtención de lípidos, ya que estos al ser degradados por las

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

microalgas son convertidos en ortofosfatos inorgánicos de la forma de ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP, lípidos, etc. (Cao et al., 2018).

Ácidos grasos libres

En la figura 7, se observa la extracción de ácidos grasos de *Scenedesmus sp.* con seis diferentes solventes y catalizador básico (KOH); Kim *et al.*, (2007), realizaron la extracción de ácidos grasos de *Scenedesmus sp.* cultivada en aguas residuales de orina de cerdo empleando metanol como solvente, el resultado obtenido fue de 0,9%; un valor mucho menor a la extracción de AGL obtenida en este estudio para metanol (9,87%). Custódio *et al.*, (2014), obtuvieron una extracción de ácidos grasos de 53% con hexano, dicho resultado es superior a todas las extracciones realizadas en este estudio con *Scenedesmus sp.*, cuyo mayor porcentaje extraído de AGL se alcanzó con metilciclohexano como solvente (28%).

El estudio de Zhang *et al.*, (2018), para *Scenedesmus sp.* cultivada en medio BG11 reporta el uso de enzimas comerciales para la disrupción de la pared celular y la posterior extracción de AGL con cloroformo: metanol (1:1 v/v), alcanzando un rango de 60,2% hasta 68,9% de ácidos grasos insaturados, que supera todos los valores de AGL de este estudio; dicho valor está directamente relacionado con la técnica de extracción empleada que para este estudio fue por el método de transesterificación sin disrupción celular previa.

En la figura 8, se observa la extracción de ácidos grasos de *Chlorella vulgaris* con seis diferentes solventes catalizador básico (KOH). El estudio de Cho *et al.*, (2013), para la misma microalga liofilizada y mezclada con agua para obtener biomasa húmeda presentó una extracción de 8,76% de AGL con cloroformo: metanol (2:1) como solvente extractor. Dicho resultado es menor a la mayoría de solventes extractores usados en la

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

actual investigación, cuyo rango de extracción varió desde 9,02% hasta 35%, con excepción del etanol cuya extracción de AGL fue de 6,36%.

En el estudio de Park *et al.*, (2014), se obtuvo una extracción de 26,5%; 34,2% y 38,5% utilizando para la reacción agua caliente a 120 °C, una mezcla de hexano:metanol como solvente y ácido sulfúrico a 0,5%, 1% y 2%, respectivamente como catalizador ácido; similares a los porcentajes de AGL de la actual investigación que se encontraron en el rango de 23,93% a 35% para cloroformo: metanol (1:2), acetato de etilo y metilciclohexano.

Las diferentes polaridades de los solventes usados en este estudio afectan la capacidad de solubilizar compuestos que se encuentran en el medio como grasas, pigmentos y azúcares, lo que interfiere en la producción de biodiesel (Salazar, 2012); los solventes no polares como el metilciclohexano, hexano y acetato de etilo son más confiables porque disuelven compuestos no hidrosolubles como los lípidos y ácidos grasos; mientras que los polares como el metanol y etanol disuelven compuestos que no son necesarios para la producción de biodiesel (Urribarrí *et al.*, 2014). Un solvente que logró disolver compuestos polares y no polares es la mezcla de cloroformo y metanol en proporción 1:2, el cual arroja buenos resultados para la extracción de aceites de microalgas con fines de obtención de biodiesel (Salazar, 2012).

FAMEs

En la figura 9, se observa la extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos de *Scenedesmus sp.* con los tres mejores solventes extractores de lípidos y AGL (acetato de etilo, cloroformo: metanol (1:2) y metilciclohexano), empleando catalizador ácido homogéneo y heterogéneo (H₂SO₄ concentrado y resina comercial CT-269, respectivamente). En la revisión bibliográfica no se encontraron resultados de FAME's

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

expresados en porcentajes en pesos como los determinados en esta investigación; la mayoría de investigaciones de FAMEs con *Scenedesmus sp.* presentan información del perfil lipídico y su análisis para determinar el potencial del uso de la especie para la obtención de biocombustibles. A continuación, se presentan trabajos con el mismo género de microalga que, aunque difieren en la especie y en el método, expresaron su contenido de FAMEs en porcentaje en peso.

Lai *et al.*, (2016), para *Scenedesmus sp.* realizó una extracción directa con resina epoxi de Spurr polimerizada, isopropanol y tensioactivos (3_DAPS, MTAB, SDS), y obtuvo un valor en el intervalo de 54% hasta 100% para extracción de FAMEs, que fueron superiores a las obtenidas en esta investigación; debido al uso de tensioactivos que provocan una ruptura en la pared celular, facilitando la extracción de grasas en la microalga. Unpaprom *et al.*, (2015), para *Scenedesmus acuminatus* cultivada en agua residual de porcicultura, obtuvieron una extracción de FAMEs del 54,65% con ácido sulfúrico como catalizador y metanol como solvente extractor, a partir de una extracción directa de la biomasa microalgal. Estos resultados son mayores de la extracción directa de FAMEs de la presente investigación usando catalizadores homogéneos y heterogéneos con metanol como solvente extractor (15,50% y 10,53%, respectivamente).

Shin *et al.*, (2014), para *Scenedesmus acutus* cultivada en medio de urea a una concentración de 0,14 g/L, realizaron una extracción de FAMEs a partir de lípidos crudos obtenidos con cloroformo: metanol (1:2), encontrando un valor de 65,08%. Dicho resultado es superior a los obtenidos en este estudio con cloroformo: metanol (1:2) y metilciclohexano con catalizadores homogéneos y heterogéneos (44% hasta 61%); mientras que los obtenidos con acetato de etilo y resina a partir de lípidos secos presentó valores de FAMEs del 69%.

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

En la figura 10, se observa la extracción de ésteres metílicos de ácidos grasos de *Chlorella vulgaris*. con los tres mejores solventes extractores (mismos empleados con *Scenedesmus sp.*) y catalizadores ácidos homogéneo y heterogéneo (H₂SO₄ conc. y resina comercial CT-269, respectivamente), para las muestras de lípidos extraídos a partir de biomasa húmeda y seca y muestras de AGL. Han *et al.*, (2014), realizaron la extracción de FAMEs con ácido sulfúrico para *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas residuales sintéticas esterilizadas en autoclave, obteniendo un valor de 44,86%. Dicho resultado es superior a los obtenidos en este estudio, los cuales fueron 9,8% y 8,75% con los catalizadores homogéneos y heterogéneos, respectivamente.

D'oca *et al.*, (2011) realizaron la extracción de FAMEs con catalizador homogéneo (H₂SO₄) y metanol a partir de lípidos extraídos con cloroformo: metanol (1:2) en *Chlorella pyrenoidosa* seca comercial, con un valor de 7,8% hasta 10,6%. Estos valores son menores que los obtenidos a partir de lípidos en esta investigación.

No fue posible encontrar investigaciones de extracción de FAMEs a partir de lípidos y AGL para solventes como el metilciclohexano con las dos especies de microalgas estudiadas en esta investigación. Otros investigadores han trabajado con solventes similares a los de este trabajo y con el mismo catalizador heterogéneo (resina comercial CT-269); tal es el caso de los resultados obtenidos en el estudio de Sánchez-Bayo *et al.*, (2020), donde se realizó la extracción de FAMEs a partir de lípidos de *Isochrysis galbana* cultivada en aguas residuales municipales, encontrando valores en el intervalo de 52% hasta 53,3% para cloroformo: metanol (1:2) y 74,1% hasta 75,9% para acetato de etilo. En comparación con el trabajo anterior, los resultados del presente trabajo son similares a las extracciones de FAMEs a partir de lípidos en biomasa húmeda y seca para *Chlorella vulgaris*, (exceptuando al solvente metilciclohexano); y para *Scenedesmus sp.* son superiores para acetato de etilo, pero inferiores para cloroformo: metanol (1:2).

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

Estas variaciones pueden estar asociadas tanto a las características de las especies, las condiciones de cultivo y nutrientes disponibles.

La extracción de FAMEs consta de varios pasos, algunos de ellos necesitan mucha energía para la disrupcion de la pared celular (agitación con vortex, sonicación, ultrasonido, etc.); para evitar estos problemas algunos investigadores sugieren realizar extracciones de FAMEs directas a partir de biomasa húmeda, en la que no es necesario el paso previo de secado y ruptura de pared celular; y aunque el tiempo de reacción de transesterificación es menor, no es posible la recuperación de catalizadores (Unpaprom *et al.*, 2015).

Los valores de FAMEs entre las especies del estudio son similares, lo cual confirma la amplia utilización de las mismas con fines de producción de biocombustibles. Para los tres tratamientos realizados (directo, lípidos húmedos y secos, y AGL), el acetato de etilo resultó ser el mejor solvente extractor, seguido de la mezcla cloroformo: metanol (1:2) y metilciclohexano. La diferencia entre las extracciones debe estar relacionada con la polaridad de los solventes (Urribarrí *et al.* 2014; Salazar, 2012), y las características de los lípidos. En este estudio se obtuvo mejores resultados de FAMEs a partir de la extracción de AGL y lípidos en comparación con la extracción directa; esto pudo deberse, a la falta de adición de solventes orgánicos no polares como el acetato de etilo, pues en la extracción de directa solo se emplea metanol. En varias investigaciones citadas anteriormente, se muestran extracciones directas con mayores porcentajes de FAMEs; esto se debe al uso de solventes orgánicos no polares o una mezcla de solventes (polar y no polar) después de la reacción de transesterificación; lo cual ayuda a la obtención de más grasas.

El uso del acetato de etilo como solvente extractor se ha extendido dado su menor toxicidad en comparación a la mezcla cloroformo: metanol, lo cual es mejor para cultivos

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

a gran escala (Sánchez-Bayo et al., 2020). El acetato de etilo según su hoja de seguridad (MSDS) es inflamable, provoca vértigo y no es nocivo para el medio ambiente (ROTH, 2019a); en el caso del cloroformo, metilciclohexano y metanol, sus hojas de seguridad (MSDS) indican que son inflamables, cancerígenos y tóxicos para el medio ambiente (ROTH, 2019b, 2019c; Soviquim, 2015).

Los resultados obtenidos en este estudio empleando aguas residuales de faenamiento porcino durante 11 días, sin dilución y sin reposición de medio, muestran que estas condiciones no generaron valores de grasa con un potencial idóneo para la obtención de biocombustibles; sin embargo, es necesario realizar otros estudios como el perfil lipídico, ensayos estandarizados característicos de biocombustibles y la comparación con normas estandarizadas nacionales e internacionales para descartar el uso del medio de cultivo con fines industriales, También podrían mejorarse los resultados considerando: dilución del medio de cultivo para reducir la carga orgánica y turbidez, suministro de diferentes concentraciones de CO₂ en el medio de cultivo, reposición de nutrientes y/o periodos de estrés por déficit nutricional, incremento en los días de cultivos, etc. (Kim et al., 2007; López-Pacheco et al., 2019; Wen et al., 2017).

5. CONCLUSIONES

En esta investigación se demostró el uso de aguas residuales de faenamiento porcino para el crecimiento y obtención de biomasa microalgal y su posterior aplicación en la extracción de lípidos con fines de obtención de biocombustibles.

En cuanto a la obtención de biomasa, se determinó que *Scenedesmus sp.* generó mayor cantidad de biomasa en comparación con *Chlorella vulgaris*.

El cultivo de estas microalgas generó una remoción de nutrientes cercana a los rangos que reportan otros autores, lo cual demuestra que estas especies pueden utilizarse

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

en procesos de biorremediación. Sin embargo, en comparación con la normativa ambiental ecuatoriana, el agua residual remanente de los cultivos no podrá ser utilizada para riego agrícola ni descargarse al sistema de alcantarillado por falta de cumplimiento de parámetros no estudiados en esta investigación.

La extracción de lípidos (biomasa seca y húmeda) y la extracción de AGL mostró un buen rendimiento con los solventes orgánicos metilciclohexano, cloroformo: metanol (1:2) y acetato de etilo en comparación con hexano, metanol y etanol. Las extracciones de FAMES en el método directo e indirecto fueron menores en comparación con las obtenidas en el método de AGL. Aunque los valores generados de lípidos, AGL y FAMES se encuentran por debajo del rango reportados en otros estudios, no se descarta que se puedan aplicar modificaciones al medio y a las condiciones de cultivo para la obtención de una mayor cantidad de grasas que mejoren el potencial de producción de biocombustibles a partir de estas dos microalgas.

6. RECONOCIMIENTO

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

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alejos, C., & Calvo, E. (2016). Biocombustibles de primera generación. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 18(2), 19–30.
- Armas Martínez, A. C., Morales Zamora, M., Albernas Carvajal, Y., & González Suárez, E. (2019). Proyección de una industria azucarera para transformarse en una biorrefinería a partir de biocombustibles de segunda y tercera generación. *Tecnología Química*, 39(3), 489–507.
- Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2017). Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal, January 2007*, 23–26.
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1–6.
- Cao, L., Zhou, T., Li, Z., Wang, J., Tang, J., Ruan, R., & Liu, Y. (2018). Effect of combining adsorption-stripping treatment with acidification on the growth of *Chlorella vulgaris* and nutrient removal from swine wastewater. *Bioresource Technology*, 263, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.094>
- Cheng, P., Osei-Wusu, D., Zhou, C., Wang, Y., Xu, Z., Chang, T., & Huo, S. (2020). The effects of refractory pollutants in swine wastewater on the growth of *Scenedesmus* sp. with biofilm attached culture. *International Journal of Phytoremediation*, 22(3), 241–250. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1658706>
- Cheunbarn, S., & Peerapornpisal, Y. (2010). Cultivation of *Spirulina platensis* using anaerobically swine wastewater treatment effluent. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(4), 586–590.
- 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>
- 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–

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

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

- Cobos, M., Castro, J., Chávez, J., & Soplín, H. (2012). Identificación De Microalgas Oleaginosas En El Área De Concesión Para Conservación, Cuenca Alta Del Río Itaya. Loreto-Perú. *Ciencia Amazónica (Iquitos)*, 2(2), 162–168. <https://doi.org/10.22386/ca.v2i2.42>
- Colorado, M., Moreno, D., & Pérez, J. (2013). Desarrollo , producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. *Ambiente y Desarrollo*, 17(32), 113–126.
- Custódio, L., Soares, F., Pereira, H., Barreira, L., Vizetto-Duarte, C., Rodrigues, M. J., Rauter, A. P., Alberício, F., & Varela, J. (2014). Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: Possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 151–161. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0098-0>
- D'oca, M. G. M., Viêgas, C. V., Lemões, J. S., Miyasaki, E. K., Morón-Villarreyes, J. A., Primel, E. G., & Abreu, P. C. (2011). Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy*, 35(4), 1533–1538. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.047>
- Dalva Godoy, E. D., Oliveira, C., Sato, S., & Monteiro deCarvalho, J. C. (2011). Growth and content of *Spirulina platensis* biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. *Universidade Estadual de Maringá*, 362–373.
- Dejoe, 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>
- Di Caprio, F., Altimari, P., Toro, L., & Pagnanelli, F. (2015). Effect of lipids and carbohydrates extraction on astaxanthin stability in *Scenedesmus* sp. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 205–210. <https://doi.org/10.3303/CET1543035>
- Edenhofer, O., Pichs, R., & Sokona, Y. (2011). Fuentes de energía renovables y mitigación del cambio climático: Resumen para responsables de políticas y

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

resumen técnico. In *Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático*. [https://doi.org/ISBN 978-92-9169-331-3](https://doi.org/ISBN%20978-92-9169-331-3)

- Faba, L., Díaz, E., & Ordóñez, S. (2014). Transformación de biomasa en biocombustibles de segunda generación. *Madera y Bosques*, 20(3), 11–24. <https://doi.org/10.21829/myb.2014.203148>
- Fernandez, J. (2014). *Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas*. Universidad de Almería. <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/index.html#>
- Fernández, L., Montiel, J., Millán, A., & Badillo, J. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8, 101–115. <https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e2.2012.10.lf>
- García, C., Arbib, Z., & Perales, J. (2015). Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 6(1), 49–68.
- González, A. (2015). ¿Qué Son Las Microalgas? *Cajamar*, 11, 1–11.
- González, A. (2016). Cultivos De Microalgas a Gran Escala: Sistemas De Producción. *Cajamar*, 18, 14.
- González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2008). Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 891–898. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1571-6>
- HACH. (2014a). Nitrogen , Total. *Nitrogen, Total: Persulfate Digestion Method. DOC316.53.01085. Method 10072.*, 9, 1–8. www.hach.com
- HACH. (2014b). Organic Carbon , Total. *Organic Carbon, Total: Direct Method. DOC316.53.01095. Method 10128.*, 9, 1–8. www.hach.com
- HACH. (2014c). Phosphorus, Total: *Phosphorus, Total: Molybdovanadate with Acid Persulfate Digestion Method. DOC316.53.01123. Method 10127*, 9, 1–8. www.hach.com
- Han, L., Pei, H., Hu, W., Han, F., Song, M., & Zhang, S. (2014). Nutrient removal and

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

- lipid accumulation properties of newly isolated microalgal strains. *Bioresource Technology*, 165(C), 38–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.131>
- Hasan, R., Zhang, B., Wang, L., & Shahbazi, A. (2014). Bioremediation of Swine Wastewater and Biofuel Potential by using *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Chlamydomonas debaryana*. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 05(03), 1–20. <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000175>
- Hernández, A., & Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Huamán, Y. (2011). Cultivo Masivo de Microalgas en Biorreactores Verticales. *Universidad Nacional de San Agustín*, 61. [http://190.116.33.230/bitstream/123456789/2110/1/Ynga Huamán%2C G..pdf](http://190.116.33.230/bitstream/123456789/2110/1/Ynga%20Huamán%20G..pdf)
- 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>
- Kim, M. K., Park, J. W., Park, C. S., Kim, S. J., Jeune, K. H., Chang, M. U., & Acreman, J. (2007). Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresource Technology*, 98(11), 2220–2228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.031>
- Lai, Y. J. S., Francesco, F. De, Aguinaga, A., Parameswaran, P., & Rittmann, B. E. (2016). Improving lipid recovery from *Scenedesmus* wet biomass by surfactant-assisted disruption. *Green Chemistry*, 18(5), 1319–1326. <https://doi.org/10.1039/c5gc02159f>
- Loera, M., & Olguín, E. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Latinoam Biotecnol Amb Alga*, 1, 91–116. http://www3.inecol.edu.mx/relbaa/images/docs/loera_olguin_2010_revlatinoambiotecnolambalgal_v1n1.pdf
- López-Pacheco, I. Y., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Silva-Núñez, A.,

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

- Arévalo-Gallegos, A., Barceló, D., Afewerki, S., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldívar, R. (2019). Combination of nejayote and swine wastewater as a medium for *Arthrospira maxima* and *Chlorella vulgaris* production and wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 676, 356–367. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.278>
- Luo, L., He, H., Yang, C., Wen, S., Zeng, G., Wu, M., Zhou, Z., & Lou, W. (2016). Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. *Bioresource Technology*, 216, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.059>
- Ma, C., Wen, H., Xing, D., Pei, X., Zhu, J., Ren, N., & Liu, B. (2017). Molasses wastewater treatment and lipid production at low temperature conditions by a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0797-x>
- Makareviciene, P. D. V., Andrulevičiūtė, V., Skorupskaitė, V., & Kasperovičienė, J. (2011). Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock. *Environmental Research, Engineering and Management*, 57(3), 21–27. <https://doi.org/10.5755/j01.erem.57.3.476>
- Mezzomo, N., Saggiorato, A. G., Siebert, R., Tatsch, P. O., Lago, M. C., Hemkemeier, M., Costa, J. A. V., Bertolin, T. E., & Colla, L. M. (2010). Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 173–178. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612010000100026>
- Narváez, P., Sánchez, F., Torres, J., & Ponce De León, L. (2004). Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos : variables asociadas al proceso de transformación *
Fatty acid methyl esters production : chemical process variables. *INGENIERIA DE INVESTIGACIÓN*, 55, 41–50.
- Onay, M., Sonmez, C., A. Oktem, H., & Yucel, M. (2016). Evaluation of various extraction Techniques for efficient lipid Recovery from Thermo-resistant microalgae, *Hindakia*, *Scenedesmus* and *Micractinium* Species. *American Journal of Analytical Chemistry*, 7(2), 141–150. <https://doi.org/10.4236/ajac.2016.72012>
- Ortiz, M., Cortés, C., Sánchez, J., Otero, A., & Padilla, J. (2012). Evaluación del

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotroficas y mixotroficas. *Orinoquia*, 16(1), 11.

<https://doi.org/10.22579/20112629.224>

- Park, J. Y., Nam, B., Choi, S. A., Oh, Y. K., & Lee, J. S. (2014). Effects of anionic surfactant on extraction of free fatty acid from *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 166, 620–624. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.098>
- Qin, L., Shu, Q., Wang, Z., Shang, C., Zhu, S., Xu, J., Li, R., Zhu, L., & Yuan, Z. (2014). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in dairy wastewater pretreated by UV irradiation and sodium hypochlorite. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2), 1121–1130. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0576-5>
- Ramos, F. D., & Villar, M. A. (2016). Biocombustibles. *Universidad Nacional Del Sur-Conicet*, 25, 69–73.
http://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/25791/CONICET_Digital_Nro.cf291889-a370-4b7a-915b-4de3e1058c97_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Ramos, L. (2014). Producción de biogás a partir de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. procedente de diferentes procesos. *Dissertation*, 282.
- ROTH. (2019a). Ficha de datos de seguridad (acetato de etilo). *Roth*, 2006(1907), 1–18.
https://www.carlroth.com/downloads/sdb/es/0/SDB_0183_ES_ES.pdf
- ROTH. (2019b). Ficha de datos de seguridad (metanol). *Roth*, 2006(1907), 1–18.
https://www.carlroth.com/downloads/sdb/es/0/SDB_0183_ES_ES.pdf
- ROTH. (2019c). Ficha de datos de seguridad (metilciclohexano). *Roth*, 2006(1907), 1–18. https://www.carlroth.com/downloads/sdb/es/0/SDB_0183_ES_ES.pdf
- Sacristán de Alva, M., Luna-Pabello, V. M., Cadena, E., & Ortíz, E. (2013). Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 146, 744–748. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.061>
- Salazar, L. (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

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

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>

Serna, F., Barrera, L., & Montiel, H. (2011). Impacto social y económico en el uso de biocombustibles. *Journal of Technology Management and Innovation*, 6(1), 100–114. <https://doi.org/10.4067/S0718-27242011000100009>

Shin, H. Y., Ryu, J. H., Bae, S. Y., Crofcheck, C., & Crocker, M. (2014). Lipid extraction from *Scenedesmus* sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. *Fuel*, 130, 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.04.023>

Soviquim. (2015). HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD (cloroformo). *Soviquim*.

Tejeda-Benítez, L., Henao-Argumedo, D., Alvear-Alayón, M., & Castillo-Saldarriaga, C. R. (2015). Characterization and lipid profile of oil from microalgae. Caracterização e perfil lipídico de azeites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería (Fac. Ing.)*, Mayo-Agosto, 24(39), 43–54. <https://www.redalyc.org/pdf/4139/413940776005.pdf>

Unpaprom, Y., Tipnee, S., & Rameshprabu, R. (2015). Biodiesel from green alga *Scenedesmus acuminatus*. *International Journal of Sustainable and Green Energy*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.11648/j.ijrse.s.2015040101.11>

Urribarrí, A., Zabala, A., Sánchez, J., Arenas, E., Chandler, C., Rincón, M., González, E., & Mazzarri, C. A. (2014). Evaluación del potencial de la borra de café como materia prima para la producción de biodiesel Evaluation of the Potential for Used Coffee Grounds as Raw Material for Biodiesel Production. *Multiciencias*, 14(2), 129–139. <http://www.redalyc.org/pdf/904/90432601006.pdf>

Veuthey, J., & Grima, M. (2015). Depuración purine en fotobiorreactores abierto. *Universidad de Almería*.

Wang, M., Wu, Y., Li, B., Dong, R., Lu, H., Zhou, H., & Cao, W. (2015). Pretreatment of poultry manure anaerobic-digested effluents by electrolysis, centrifugation and autoclaving process for *Chlorella vulgaris* growth and pollutants removal. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 36(7), 837–843. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.963695>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

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>

Zhang, Y., Kong, X., Wang, Z., Sun, Y., Zhu, S., Li, L., & Lv, P. (2018). Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae *Scenedesmus* sp. *Renewable Energy*, 125, 1049–1057.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.01.078>

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

8. ANEXOS

Anexo A

Tabla 4: Crecimiento celular de *Scenedesmus sp.* y *Chlorella vulgaris* cultivada en agua de faenamiento porcino durante 11 días de cultivo. Conteo celular (cel/mL), Absorbancia a una longitud de onda de 680 nm y Peso seco (g/L).

Crecimiento celular						
Días	<i>Scenedesmus sp.</i>			<i>Chlorella vulgaris</i>		
	Concentración celular (cel/mL)	Absorbancia (680nm)	Peso seco (g/L)	Concentración celular (cel/mL)	Absorbancia (680nm)	Peso seco (g/L)
0	2,5E+05 ± 0	0,648 ± 0,11	0,02	1,88E+05 ± 0	0,229 ± 0,02	0,04
1	5,55E+05 ± 3,31*10 ⁴	0,962 ± 0,26	0,22	3,72E+05 ± 1,48*10 ⁵	0,429 ± 0,09	0,07
2	8,79E+05 ± 1,65*10 ⁴	1,507 ± 0,13	0,25	1,04E+06 ± 1,99*10 ⁵	0,957 ± 0,17	0,08
3	8,53E+05 ± 7,92*10 ⁴	1,613 ± 0,2	0,28	2,2E+06 ± 4,42*10 ⁴	1,32 ± 0,06	0,13
4	9,95E+05 ± 1,61*10 ⁵	1,687 ± 0,16	0,34	2,45E+06 ± 3,65*10 ⁵	1,475 ± 0,12	0,15
5	1,33E+06 ± 1,53*10 ⁵	1,843 ± 0,18	0,35	2,54E+06 ± 2,54*10 ⁵	1,5 ± 0,07	0,16
6	1,62E+06 ± 1,22*10 ⁵	1,949 ± 0,08	0,35	2,76E+06 ± 1,49	1,682 ± 0,01	0,17
7	1,52E+06 ± 1,1*10 ⁵	2,035 ± 0,14	0,4	2,92E+06 ± 7,18*10 ⁴	1,795 ± 0,12	0,18
8	1,93E+06 ± 1,65*10 ⁴	2,295 ± 0,18	0,44	3,95E+06 ± 1,56*10 ⁵	2,09 ± 0,04	0,21
9	2,07E+06 ± 9,87*10 ⁴	2,416 ± 0,20	0,45	5,53E+06 ± 2,87*10 ⁵	2,138 ± 0,11	0,23
10	1,99E+06 ± 1,1*10 ⁴	2,44 ± 0,07	0,43	4,97E+06 ± 1,41*10 ⁵	2,181 ± 0,01	0,2
11	1,98E+06 ± 1,4*10 ⁵	2,352 ± 0,04	0,41	4,58E+06 ± 3,87*10 ⁴	2,168 ± 0,08	0,2

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

Anexo B

Tabla 5: Remoción de nutrientes del agua de faenamiento porcino durante 11 días de cultivo con *Scenedesmus sp.* y *Chlorella vulgaris*. Nitrógeno total (g/L N), Fósforo total (g/L PO_4^{3-}) y Carbono Total (g/L C).

Propiedades fisicoquímicas						
Días	<i>Scenedesmus sp.</i>			<i>Chlorella vulgaris</i>		
	Nitrógeno total (g/L N)	Fósforo total (g/L PO_4^{3-})	Carbono total (g/L C)	Nitrógeno total (g/L N)	Fósforo total (g/L PO_4^{3-})	Carbono total (g/L C)
0	70,5 ± 7,12	98,45 ± 2,35	368,5 ± 71,84	90,5 ± 6,12	49,55 ± 11,19	371 ± 51,72
1	49,5 ± 2,12	78,95 ± 6,71	276 ± 25,45	82 ± 4,41	43,25 ± 0,21	308,5 ± 17,67
2	39,5 ± 3,53	53 ± 0,84	170 ± 12,72	48,5 ± 3,53	34,2 ± 3,25	242 ± 2,82
3	38 ± 4,24	49,8 ± 0,28	164 ± 27,57	32 ± 4,24	31,3 ± 0,7	186,5 ± 19,09
4	34,5 ± 4,94	49,6 ± 0,28	158 ± 22,16	27 ± 2,82	30,3 ± 0,28	163 ± 26,87
5	31,5 ± 4,94	49,35 ± 0,21	152 ± 24,04	26 ± 2,82	30,2 ± 0,14	155,5 ± 19,09
6	29,5 ± 3,53	49 ± 0,28	148,5 ± 26,16	25,5 ± 4,94	29,9 ± 0,28	147,5 ± 23,33
7	25,5 ± 2,12	46,55 ± 2,47	161 ± 8,48	25 ± 2,82	29,7 ± 0,56	143 ± 24,04
8	26,5 ± 3,53	44,55 ± 1,2	158 ± 11,31	21 ± 1,41	27,7 ± 2,82	139,5 ± 24,74
9	24 ± 8,48	44,95 ± 0,35	152 ± 0	18,5 ± 0,7	26,7 ± 2,12	125,5 ± 21,92
10	23,5 ± 4,94	41,75 ± 0,07	158 ± 0,7	16 ± 2,82	24,5 ± 0,14	106 ± 1,14
11	22 ± 3,41	39,05 ± 3,61	144 ± 49,41	11,5 ± 3,53	22,85 ± 3,35	96,5 ± 6,12

Anexo C

Tabla 6: Determinación de grasas lipídicas a partir de biomasa húmeda y seca y AGL de biomasa seca en *Scenedesmus sp.* y *Chlorella vulgaris*

Extracción de lípidos y AGL						
Solventes	<i>Scenedesmus sp.</i>			<i>Chlorella vulgaris</i>		
	Húmedo	Seco	AGL	Húmedo	Seco	AGL
Hexano	4,25%	6,13%	12,82%	5,12%	6,36%	14%
Metanol	1,24%	1,58%	9,87%	3,31%	4,27%	9,02%
Etanol	1,09%	1,97%	5,62%	3,37%	3,61%	6,36%
Cloroformo: Metanol (1:2)	7,45%	16,65%	19,40%	10,70%	21,49%	23,93%
Acetato de Etilo	6,31%	14,25%	22,96%	7,57%	14,31%	32,70%
Metilciclohexano	8,51%	18,91%	28,02%	13,40%	18,50%	35%

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL DE ORIGEN PORCINO

Anexo D

Tabla 7: Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) en *Scenedesmus sp.* y *Chlorella vulgaris*

Extracción de directa, indirecta y FAMES					
Solventes		<i>Scenedesmus sp.</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
		FAMES		FAMES	
		CT-269	H₂SO₄	CT-269	H₂SO₄
Directo		15,50%	10,53%	9,08%	8,75%
Cloroformo: Metanol (1:2)	L. húmedos	54,50%	51,50%	56%	47,50%
	L. seco	61%	55%	59,50%	50,50%
	AGL	71,50%	67,50%	73,50%	70,50%
Acetato de Etilo	L. húmedos	57%	55%	58,50%	52,50%
	L. seco	69%	59%	73%	62,25%
	AGL	89,50%	84%	80,50%	73,00%
Metilciclohexano	L. húmedos	51%	44%	52%	44,50%
	L. seco	52%	47%	57,50%	49,50%
	AGL	66%	52,50%	56%	51%