

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

**Bibliotecas Bucaramanga
Universidad Santo Tomás**

**CULTIVO A PEQUEÑA ESCALA DE MICROALGAS DE LA ESPECIE *Chlorella vulgaris*
PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE**

MARÍA DEL PILAR NUÑEZ CASTELLANOS

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2017**

**CULTIVO A PEQUEÑA ESCALA DE MICROALGAS DE LA ESPECIE *Chlorella vulgaris*
PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE**

MARÍA DEL PILAR NUÑEZ CASTELLANOS

Trabajo de grado para optar el título de Química Ambiental

**Director del proyecto
Julio Roberto Pinzón Joya
Químico, PhD**

**Codirectora del proyecto
Yoleisy Orduz Díaz
Química Ambiental**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2017**

DEDICATORIA

A Dios por haberme regalado una familia maravillosa y darme la oportunidad de realizar mis estudios.

A mis padres por ser mi apoyo incondicional durante todo el proyecto, por creer en mí y darme la oportunidad de estudiar para llegar a tener un mejor futuro, por inculcarme valores como el amor y la responsabilidad para ser un profesional ético y humano.

A Juan Carlos Lozano España, por estar conmigo en los buenos y malos momentos y darme su amor, apoyo y a mi regalo más grande a mi hija Emma Sofía, por brindarme su amor incondicional y ser el motor para cumplir esta meta.

A mis profesores por inculcarme todos los conocimientos requeridos para ser un buen profesional

Autor

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo le agradezco a Dios por darme la vida y regalarme una familia llena de amor y comprensión.

A mis padres por darme la oportunidad de realizar mis estudios universitarios, por ser mi apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto y colaborar en las situaciones más difíciles.

A mi hermana Andrea por ser alguien incondicional en todo el transcurso de mi vida personal y profesional, le agradezco todo lo que ha hecho por mí y mi bebé.

A Juan Carlos Lozano España por ser mi otra mitad, por brindarme su amor, apoyo y estar conmigo en las buenas y malas decisiones. Gracias por estos 4 años de alegrías y tristezas y su persistencia en el desarrollo y culminación de mi carrera profesional.

A mi hija Emma Sofía por ser el motor de mis proyectos, la alegría de mi vida y la razón por salir adelante y ser una mejor profesional y persona.

A mi codirectora Yoleisy Orduz Díaz por ser un apoyo incondicional durante el desarrollo del proyecto y además por su maravillosa amistad durante estos años de carrera profesional

Al profesor Julio R. Pinzón por darme la oportunidad de trabajar con él en el desarrollo del proyecto de grado, por su conocimiento y enseñanzas.

A la Universidad Santo Tomás y en especial al Grupo de Investigación (GINMEA) y la Universidad Industrial de Santander por su colaboración durante el desarrollo del proyecto.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN	15
1 CULTIVO A PEQUEÑA ESCALA DE MICROALGAS DE LA ESPECIE <i>Chlorella vulgaris</i> PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE	16
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.2 JUSTIFICACIÓN	17
1.3 OBJETIVOS	18
1.3.1 Objetivo general	18
1.3.2 Objetivos específicos	18
2 MARCO REFERENCIAL	19
2.1 MARCO TEÓRICO	19
2.1.1 Microalgas	19
2.1.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	20
2.1.3 Sistemas de cultivo de las microalgas	21
2.1.4 Producción de microalgas a gran escala	23
2.1.5 Composición del aceite de microalga	24
2.1.6 Producción de biodiesel a partir de microalgas	24
2.2 ANTECEDENTES	25
2.2.1 Aplicaciones de sistemas de cultivo a gran escala	25
2.2.2 Cultivo de microalgas a pequeña escala	27
2.2.3 Extracción de aceites a partir de biomasa de microalgas	27
2.2.4 Desactivación de lipasas	28
2.2.5 Otras aplicaciones de las microalgas	28
3 DISEÑO METODOLÓGICO	30
3.1 EQUIPOS	30
3.2 REACTIVOS Y MATERIALES	30
3.3 MANTENIMIENTO DEL INÓCULO DE <i>Chlorella vulgaris</i>	30
3.4 PRETRATAMIENTO DEL AGUA	31
3.5 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	31
3.6 DISEÑO FOTOBIOREACTOR	32
3.7 CONTEO CELULAR DE LAS MICROALGAS	33
3.8 OBTENCIÓN BIOMASA	34
3.9 TRANSESTERIFICACIÓN DIRECTA CON CATALIZADOR ÁCIDO DE LA BIOMASA DE MICROALGAS	36
3.10 CARACTERIZACIÓN DEL BIODIESEL	37
3.10.1 Análisis FT – IR	37
3.10.2 Análisis de RMN ¹ H	37
3.10.3 Análisis GC – FID	37

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Crecimiento microalgal	38
4.2 Producción de biodiesel de microalgas	41
5 CONCLUSIONES	46
6 DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	51

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Rendimiento del aceite de las diferentes fuentes de biodiesel	16
Tabla 2. Comparación del contenido lipídico de las microalgas con otros alimentos	19
Tabla 3. Comparación del contenido lipídico de diferentes especies de microalgas	20
Tabla 4. Rendimientos de extracción de aceites de las microalgas <i>Nannoclo-ropis oculata</i>	27
Tabla 5. Composición del medio de cultivo	31
Tabla 6. Perfil de los metil ésteres de los ácidos grasos (% total de FA-MEs)(ácidos saturados e insaturados)	44

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Célula de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	21
Figura 2. Estanque Raceway y sus partes	22
Figura 3. Fotobiorreactor de columna vertical	23
Figura 4. Reacción de transesterificación de los triglicéridos con alcohol	25
Figura 5. Fotobiorreactor del inóculo de las microalgas especie <i>Chlorella vulgaris</i>	31
Figura 6. Fotobiorreactor en funcionamiento	33
Figura 7. Microalgas de la especie <i>Chlorella vulgaris</i> en microscopio 40X	34
Figura 8. Concentración de biomasa de las microalgas de especie <i>Chlorella vulgaris</i>	35
Figura 9. Liofilización de la biomasa de las microalgas de especie <i>Chlorella vulgaris</i>	36
Figura 10. Transesterificación directa de la biomasa microalgal	37
Figura 11. Curva de crecimiento del experimento uno	38
Figura 12. Curva de crecimiento del experimento dos	39
Figura 13. Curva de crecimiento del experimento tres	40
Figura 14. Espectro de RMN ¹ H biodiesel microalga en CDCl ₃	41
Figura 15. Espectro IR biodiesel microalga	42
Figura 16. Espectro IR biodiesel <i>Caryocar brasiliense</i> Camb.	43
Figura 17. Perfil de los metil ésteres de ácidos grasos del biodiesel de microalga	43
Figura 18. Publicación de resultados de biodiesel de microalgas	47

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Composición solución A ₅	51
Anexo 2. Mezcla de 37 compuestos de FAMES	52
Anexo 3. Datos adicionales de la mezcla estandarizada	53
Anexo 4. Perfil de ácidos grasos de biodiesel de microalgas	54
Anexo 5. Datos adicionales del % de área de cada ácido graso de la mezcla	55

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BHT	2,6-di-terc-butil-4-(hidroxietil)fenol
FAAE	Fat Acid Alkyl Esters - Alquil ésteres de ácidos grasos
IR	Espectroscopía Infrarroja
RMN	Resonancia magnética nuclear
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
GC – FID	Gas chromatography – flame ionization detector

GLOSARIO

Biocombustible: producido a partir de organismos vivos y sus compuestos metabólicos y contiene más del 80 % de materia prima renovable.¹

Biodiesel: Éster monoalquilo con cadena larga de ácidos grasos derivados de materias primas renovables como aceite vegetal o grasa animal, siendo biodegradable y no tóxico.²

Biomasa: Material biológico derivado de un organismo vivo, cuando se habla de la utilizada para la energía se refiere al material a base de plantas, microalgas o material animal.³

Fotobiorreactor: Dispositivo utilizado para el cultivo masivo de las microalgas, donde se debe mantener un medio estable y proporcionar las condiciones necesarias para su crecimiento.⁴

Liofilización: Proceso de secado en la cual el solvente y/o el medio de suspensión se cristaliza a bajas temperaturas pasando directamente de sólido a gas, eliminando la totalidad del agua libre contenida en el producto.⁵

Microalga: Alga microscópica, que se puede encontrar en agua dulce o salada. Son especies unicelulares y dependiendo de la especie sus tamaños pueden variar a unos pocos cientos micrómetros, además son microorganismos fotosintéticos e importantes para la vida en la tierra produciendo la mitad del oxígeno atmosférico y utilizando casi simultáneamente gases de efecto invernadero como el CO₂.⁶

Transesterificación: Proceso de conversión de aceite vegetal a biodiesel,⁷ donde reaccionan un triglicérido con un alcohol para formar alquil ésteres y glicerol.⁸

CULTIVO A PEQUEÑA ESCALA DE MICROALGAS DE LA ESPECIE *Chlorella vulgaris* PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE

M. P. Nuñez Castellanos, Y. Orduz, J. R. Pinzón.

RESUMEN

La dependencia de los combustibles fósiles tiene consecuencias medioambientales perjudiciales como el aumento de los gases de efecto invernadero, contaminación de aguas y suelos. Por esta razón se han incrementado las investigaciones en la búsqueda de energía renovables y una de ellas es el uso de las microalgas. Las microalgas tienen la ventaja de absorber mayores cantidades de CO₂ mediante la fotosíntesis, descontaminar aguas, no necesitan grandes extensiones de terreno y su crecimiento es veloz comparado con otros cultivos energéticos. En el presente trabajo se implementó un cultivo mixotrófico a pequeña escala de la microalga de la especie *Chlorella vulgaris* ubicado en las instalaciones de la sede El Limonal de la Universidad Santo Tomás, Piedecuesta, Santander. La etapa de crecimiento fue de 14 días, posteriormente la biomasa fue concentrada por decantación seguida de centrifugación y finalmente liofilización obteniéndose así un total de 35 g de biomasa seca. Esta biomasa se transesterificó directamente con metanol y ácido clorhídrico y se obtuvo un total de 2,58 g de biodiesel. El biodiesel preparado se caracterizó por RMN, FTIR y GC – FID comprobando la presencia del metil ésteres de ácidos grasos principalmente ácido palmítico y linoléico.

PALABRAS CLAVES: Aceite, biodiesel, biomasa, *Chlorella vulgaris*, fotobiorreactor, microalgas.

SMALL SCALE MICROALGAE(*Chlorella vulgaris*) CULTIVATION FOR THE OBTENTION OF OIL

M. P. Nuñez Castellanos, Y. Orduz, J. R. Pinzón.

ABSTRACT

Dependence on fossil fuels has adverse environmental consequences, such as the increasing of greenhouse gases, contamination of water and soil pollution. For this reason the search for renewable energy has increased and the use of microalgae is one of them. Microalgae absorb a larger amount of CO₂ through photosynthesis, they decontaminate water, they do not need large land extensions and they grow faster compared to terrestrial energetic crops. This work implemented a mixotrophic small-scale cultivation of *Chlorella vulgaris* at "El Limonal" farm, property of "Universidad Santo Tomás" which is located at Piedecuesta, Santander. The growing period was 14 days, then the biomass was decanted, centrifuged and lyophilized to obtain a total of 35 g of dry biomass. The biomass was transesterified directly with methanol and hydrochloric acid obtaining 2,58 g of biodiesel. The biodiesel was characterized by NMR, FTIR and GC-FID which showed the presence of methyl esters of fatty acids mainly palmitic and linoleic acid.

KEYWORDS: Biodiesel, biomass, *Chlorella vulgaris*, microalgae, oil, photobioreactor.

INTRODUCCIÓN

El incremento de la demanda global de energía ha creado dependencia por los combustibles fósiles. Su carácter no renovable ha planteado numerosos problemas como el calentamiento global.⁹ En la actualidad la inversión en energías renovables está centrada en el sector eléctrico. En países como China, Estados Unidos, Alemania, Brasil y Canadá la inversión en generación de electricidad desde fuentes renovables representa más del 56 % de la nueva capacidad instalada en el año 2013. En el caso de los biocombustibles, estos cubren alrededor del 3 % de la demanda total de combustible del transporte por carretera y alrededor del 2,3 % de la demanda de combustible líquido total (incluye el combustible utilizado en los aviones pequeños).⁹

Entre las materias primas que se utilizan para la producción de biocombustibles se encuentran el aceite de soja y el de palma africana principalmente, pero estos cultivos afectan de manera adversa la producción de otros alimentos tanto para animales como para seres humanos. Por esta razón, se ha propuesto el uso de microorganismos fotosintéticos como las microalgas para prevenir una crisis alimentaria. Las microalgas no necesitan terreno cultivable convencional por lo que pueden dedicarse otros espacios para la producción de biomasa. Adicionalmente, las microalgas pueden crecer en la mayoría de condiciones ambientales como en estanques, fotobiorreactores y aguas residuales de gran gama de pH y composición química.¹⁰

La producción de biodiesel a largo plazo evitaría la dependencia de los combustibles fósiles, crearía un incremento económico en las zonas rurales al generar nuevos empleos y disminuiría la producción de gases de efecto invernadero. Por estas razones el objetivo del trabajo fue la implementación de un cultivo de microalgas a pequeña escala en las instalaciones de la Universidad Santo Tomás de Bucaramanga, para la producción de biodiesel.

1. CULTIVO A PEQUEÑA ESCALA DE MICROALGAS DE LA ESPECIE *Chlorella vulgaris* PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la humanidad afronta una problemática energética debido a que la mayor parte de la energía consumida proviene de los combustibles fósiles cuya tasa de consumo es 1×10^5 veces más alta de lo que naturaleza puede crear. Sumado a esto el incremento de CO₂ en la atmósfera es responsable del calentamiento global² y a su vez de todos los problemas causados por el cambio climático. Esta situación ha creado una demanda por nuevas alternativas basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el medio ambiente que ayuden a la reducción del CO₂. Una alternativa son los biocombustibles que traen varios beneficios como: la no dependencia de petróleo extranjero y beneficios a los agricultores locales.¹¹

Los biocombustibles se producen a partir de aceites vegetales, aceites de cocina usados, grasas animales o lípidos de microalgas. El uso de biocombustibles es favorable porque tienen un bajo contenido de azufre y emiten menos CO porque su combustión es más completa. No contiene compuestos aromáticos ni otras sustancias químicas que son dañinas para el medio ambiente y la salud humana. Es considerado mejor que el diésel en términos de punto de inflamación y biodegradación. La Tabla 1 presenta algunas materias primas utilizadas para la producción de biodiesel incluyendo las microalgas, el rendimiento de aceite que se puede obtener por hectárea de cultivo y el terreno requerido en millones de hectáreas para cubrir el 50 % de la demanda del sector del transporte en Estados Unidos.²

Tabla 1. Rendimiento del aceite de las diferentes fuentes de biodiesel

Fuente	Rendimiento del Aceite (L/Ha)	Requerimiento de terreno (Mha) *
Maíz	172	1540
Soja	446	594
Canola	1190	223
Jatrofa	1892	140
Coco	2689	99
Palma aceitera	5950	45
Microalga (40 % en peso seco)	70 405	7,6
Microalga (20 % en peso seco)	35 202	15,2

* Terreno requerido para cubrir el 50 % de la demanda de combustibles del sector del transporte en USA

Como se pudo observar en la Tabla 1, las microalgas son una buena opción para la generación de biodiesel por uso reducido de terreno para su crecimiento, su adaptación en diferentes condiciones ambientales y su rápida reproducción.¹²

1.2. JUSTIFICACIÓN

La necesidad de nuevas fuentes energéticas seguirá aumentando a medida que las reservas de petróleo disminuyan y el precio de extracción siga aumentando. Por esta razón es necesario utilizar organismos fotosintéticos, que tienen la capacidad de reducir la emisión de CO₂ y aumentar la sustentabilidad.¹³ Las microalgas tienen varias ventajas para la producción de biodiesel y otros biocombustibles ya que utilizan el CO₂ y la luz solar con mayor eficiencia fotosintética en comparación con las plantas terrestres.¹⁴ Su crecimiento es veloz comparado con otros cultivos y por esto producen grandes cantidades de biomasa por unidad de terreno utilizado para su cultivo. Además al utilizar cultivos como el maíz como materia prima para la producción de biocombustible se crea una competencia negativa entre el consumo alimentario y la producción de combustible.

Las microalgas tienen gran potencial para contrarrestar el efecto invernadero y descontaminar agua porque a través de la fotosíntesis absorben el CO₂ liberado por las industrias y pueden absorber iones NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻ e iones de metales pesados presentes en el agua.² Además las microalgas se consideran una materia prima viable, ya que su contenido lipídico es alto; en el caso de *Chlorella vulgaris* este se encuentra en el rango de (5,0–58,0) % de aceite en peso seco.¹⁵ Sin embargo, es necesario implementar cultivos a una escala mayor para generar una cantidad significativa de biomasa que pueda ser utilizada en la producción de aceite de microalga y este a su vez en biodiesel.¹⁵ Para que el potencial de productos *bio* como las microalgas se haga realidad, es necesario que la producción de biomasa cumpla con las demandas de materia prima. Por esto, es necesario estudiar la implementación de cultivos a mayor escala que se pueden operar de manera segura y confiable. Estos sistemas son importantes en la evaluación del potencial de productividad, la aclaración de las cuestiones de protección de los cultivos y el establecimiento de líneas base para mejoría futura de los cultivos, tanto en el laboratorio como en el exterior.¹³

La finalidad de este proyecto fue la implementación de un cultivo a pequeña escala de las microalgas de especie *Chlorella vulgaris* en las instalaciones de la finca El Limonal ubicado en Piedecuesta, Santander, en donde se produjo la biomasa necesaria para la generación d extracto graso a base de este microorganismo y se realizaron análisis para determinar su composición como biodiesel.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

- ✓ Escalar un cultivo de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* a pequeña escala con el fin de obtener 100 mL de extracto graso.

1.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Diseñar y construir el fotobiorreactor para cultivar las microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*
- ✓ Obtener los extractos grasos de la biomasa alcanzada por las microalgas en estudio
- ✓ Caracterizar el extracto de la microalga *Chlorella vulgaris* por espectrometría de masas
- ✓ Transesterificar los triglicéridos obtenidos y evaluar su distribución de ácidos grasos

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1. Microalgas

Las microalgas son microorganismos que pueden crecer en agua dulce o marina en casi todas las condiciones medioambientales. Su cultivo y crecimiento no causa deforestación y no hay conflicto con la producción de alimentos, ya que no compite con las tierras agrícolas.¹⁶ Se ha estimado que existen más de 50 000 especies, donde sólo 30 000 han sido estudiadas y analizadas. Su ciclo de crecimiento es rápido, debido a que son microorganismos autótrofos y mediante la fotosíntesis, convierten la energía solar en energía química.¹²

Debido a su capacidad de crecimiento en diferentes condiciones ambientales, es posible encontrar especies mejor adaptadas a los ambientes locales o características de crecimiento específicos, que no es posible hacer con otros materiales utilizados para la generación de biodiesel. Sus tasas de productividad en relación con el requerimiento de espacio es de 40 a 132 veces menor en comparación con otros alimentos, como se observa en la Tabla 2.¹² Además su biomasa produce tres componentes bioquímicos principales que son los carbohidratos, las proteínas y los lípidos, en donde las microalgas generan una mayor cantidad de lípidos que las plantas terrestres y por esta razón el aceite de microalga y su biomasa es ofrecido como materia prima para la generación de biodiesel. Sus lípidos contienen el doble de la energía almacenada por los átomos de carbono que los carbohidratos, lo que lleva a un doble aumento en contenido energético del biocombustible.¹⁷

Tabla 2. Comparación del contenido lipídico de las microalgas con otros alimentos¹⁵

Planta	Contenido lipídico (% de Aceite en peso de biomasa)	Terreno (m ² año/ kg biodiesel)	Productividad en biodiesel (kg biodiesel/ ha año)
Maíz (<i>Zea mays</i> L)	44	66	152
Hachís (<i>Cannabis sativa</i> L)	33	31	321
Jatrofa (<i>Jatropha curcas</i> L)	28	15	656
Palma Aceitera (<i>Elais guineensis</i>)	36	2	4747
Microalga (bajo contenido de aceite)	30	0,2	51 927
Microalga (medio contenido de aceite)	50	0,1	86 515

... continúa en la siguiente página

Tabla 2. . . continuación

Planta	Contenido lipídico (% de Aceite en peso de biomasa)	Terreno (m ² año/ kg biodiesel)	Productividad en biodiesel (kg biodiesel/ ha año)
Microalga (alto contenido de aceite)	70	0,1	121 104

Muchas especies de microalgas tienden a acumular grandes cantidades de lípidos y puede variar según a las condiciones de crecimiento. Varias diferencias son evidenciadas en la Tabla 3 entre las distintas especies, e incluso dentro de un mismo género. Donde el contenido de aceite en microalgas alcanza el 75 % en *Botryoccus braunii*. Además las microalgas más comunes como el género *Chlorella*, poseen niveles de aceite entre (10–60) %^{15,18}

Tabla 3. Comparación del contenido lipídico de diferentes especies de microalgas¹⁵

Especie de Microalga	Contenido lipídico (% peso en seco)
<i>Botryoccus braunii</i>	25,0 – 75,0
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0 – 63,0
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 – 58,0
<i>Chlorella sp</i>	10,0 – 48,0
<i>Chlorococcum sp</i>	19,3
<i>Dunaliella sp</i>	17,5 – 67,0

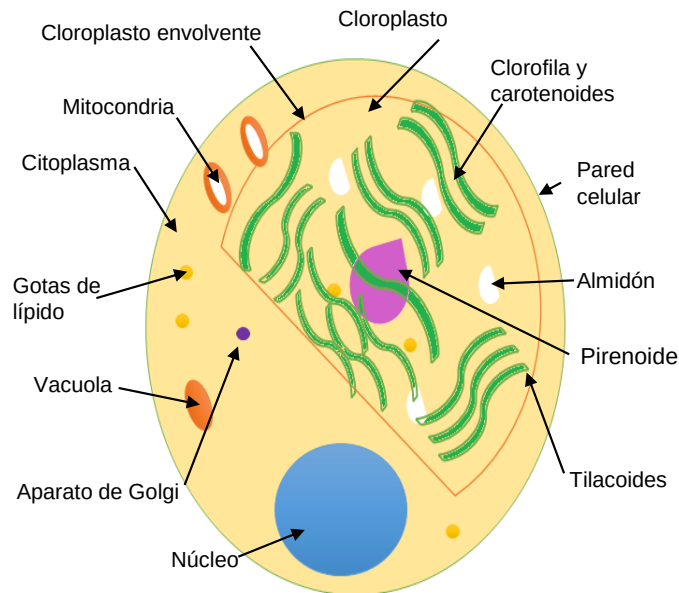
2.1.2. *Chlorella vulgaris*

La microalga verde más notable es la *Chlorella vulgaris*. Donde en 1890 un investigador holandés llamado Martinus Willem Beijerinck, descubrió que ella era la primera microalga con núcleo definido. El nombre *Chlorella* proviene de la palabra griega *Chloros* que significa verde y del sufijo Latín *ella* que se refiere a tamaño microscópico.¹⁶

Su morfología consiste en una célula microscópica esférica con (2–10) µm de diámetro y con elementos estructurales similares a los de una planta. Su pared celular preserva la integridad de la célula y le sirve de protección contra los invasores y los cambios ambientales súbitos. Esto puede variar de acuerdo a la fase de crecimiento y a las condiciones ambientales. Su citoplasma se compone de agua, proteínas y minerales solubles. En él alberga organelos internos como las mitocondrias, el núcleo, las vacuolas, el aparato de Golgi y un sólo cloroplasto. Cada mitocondria contiene parte del material genético, el aparato respiratorio y tiene

una membrana de doble capa rodeando todo el organelo compuesta de una relación igual de proteínas y fosfolípidos como se puede observar en la Figura 1. La *Chlorella vulgaris* se reproduce de forma asexual y rápidamente, es decir que en 24 horas una célula de *Chlorella vulgaris* cultivada en condiciones ideales se multiplica por auto-esporulación.¹⁶

Figura 1. Célula de la microalga *Chlorella vulgaris*



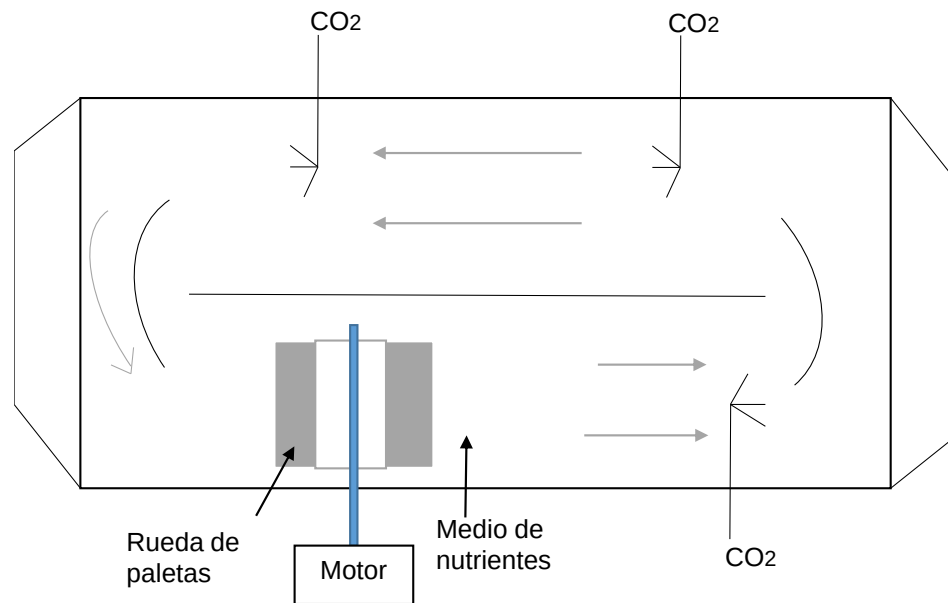
FUENTE: Autor

2.1.3. Sistemas de cultivo de las microalgas

Chlorella vulgaris es una microalga que tiene una tasa de crecimiento rápido y responde a cada conjunto de modificaciones en el medio durante su cultivo y por esta razón, se han implementado muchas técnicas de crecimiento con el fin de aumentar la productividad de biomasa, lípidos, proteínas, carbohidratos y contenido de pigmentos.¹⁹

- ✓ Estanques Raceway: Este cultivo de microalgas abierto ha sido utilizado desde la década de 1950²⁰ y son los más utilizados para estudios piloto de cultivo y en la escala comercial por su fácil configuración. Su productividad de biomasa es de (14–50) g d/m².²¹ Sus cultivos tienen una profundidad de (30–50) cm, la mezcla y la circulación es requerida para estabilizar el crecimiento y su productividad, también la mayoría son construidos en concreto o con tierra compactada. Los nutrientes son introducidos por el frente de las paletas (Figura 2) y distribuidos, la rueda de paletas esta en constante movimiento para evitar la sedimentación.²² La necesidad de CO₂ se satisface con el aire de la superficie y con aireadores sumergidos para mejorar la absorción.²⁰

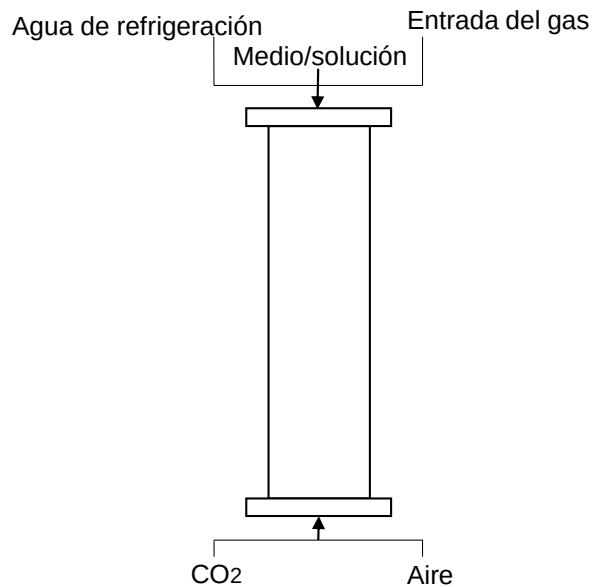
Figura 2. Estanque Raceway y sus partes



FUENTE: Autor

- ✓ Fotobiorreactor cerrado. Esta tecnología se ha implementado para mejorar algunas condiciones del fotoreactor abierto como el pH, intensidad de luz, la temperatura y la concentración de CO_2 , y de esta manera obtener una mayor concentración celular para la generación de biomasa. Estos sistemas son ideales para el crecimiento de microalgas que no pueden crecer en un medio hostil, de manera que se alimenta la biomasa con CO_2 mediante el burbujeo y para la iluminación se utilizan luces fluorescentes.¹⁶ Los tubos tienen generalmente un diámetro de 20 cm y el espesor de sus paredes transparentes es de pocos milímetros, lo que permite la absorción adecuada de la luz. Uno es el fotobiorreactor de columna vertical (Figura 3) que tiene buen transporte de las masas, buena mezcla y es utilizado para la inmovilización de células inducidas por fotooxidación y la fotoinhibición.²³
- ✓ Crecimiento Heterótrofos: Este método no requiere luz y la biomasa se alimenta de carbono, en el caso de la microalga *Chlorella vulgaris* se utiliza como fuentes de carbono a la glucosa, acetato, glicerol y glutamato, con la tasa máxima de crecimiento específico obtenido con la glucosa. La mayor desventaja de este tipo de cultivo es el precio y la disponibilidad de azúcares, que compiten con la materia prima para otros usos, como los alimentos y la producción de biocombustibles.^{21,24}
- ✓ Crecimiento Mixotrófico: La microalga *Chlorella vulgaris* es capaz de combinar técnicas tanto autótrofas y heterótrofas mediante el proceso de la fotosíntesis, así como la ingestión de materiales orgánicos, como la glucosa. Esta técnica tiene grandes ventajas como limitar el impacto de la pérdida de biomasa durante la respiración oscura y reduciendo la cantidad de sustratos orgánicos utilizados para el cultivo de la biomasa.²⁵

Figura 3. Fotobiorreactor de columna vertical



FUENTE: Autor

2.1.4. Producción de microalgas a gran escala

La producción de biomasa de microalgas a gran escala se realiza mediante estanques de rodadura abiertas en el modo por lotes. La viabilidad de este sistema continuo depende de las especies predominantes, la productividad de la biomasa, sistema de cultivo y sus condiciones. Los sistemas artificiales equipados con una rueda de paletas se utilizan para generar la circulación más simplificado para asegurar un mezclado necesario. Un cultivo a gran escala puede ser en un sistema abierto en una alcantarilla, en donde tiene varias ventajas como: el bajo coste y la simplicidad, el uso de alternativas de sustratos baratos y fácilmente disponible, el costo de capital reducido y la utilización de territorios no aptos para la agricultura y no afectar la seguridad alimentaria.¹⁷

Además en estos sistemas el CO_2 utilizado para el crecimiento de las microalgas puede ser proporcionado a través del aire del ambiente, aireación superficial, a menudo complementada por burbujeo con CO_2 o aire enriquecido en CO_2 de la parte inferior del sistema, con el fin de maximizar la producción de biomasa.²² Pero tienen ciertas desventajas como la pérdida de agua por evaporación, la productividad se ve afectada por contaminación de otros microorganismos y la concentración de biomasa siguen siendo baja por el mezclado.²⁶

Colombia posee las condiciones para cultivar algas como son: luz durante 12 h/d, lo que no ocurre en los países europeos, el clima es estable y además hay agua en abundancia, tanto dulce como salada. Por eso, lugares como el mar Caribe y los Llanos Orientales son sitios que poseen potencial para el cultivo de microalgas. Además de generar biocombustibles sostenible, las microalgas reciclan el CO_2 del ambiente de forma muy eficiente al capturar

el carbono para formar biomasa y liberando al oxígeno, es por esto que los cultivos se desarrollan mejor si tienen cerca fábricas que produzcan CO₂ constante y una hectárea cultivada de microalgas produce la misma cantidad de aceite que 10 ha de palma.²⁷

2.1.5. Composición del aceite de microalga

El contenido lípidico de las microalgas varían ampliamente de una especie a otra y en términos de biomasa seca del (5–77) %, ya que han estudiado más de 40 especies de microalgas en Australia y se llegó a la conclusión que el contenido de lípidos es de (5–20) % en peso de la masa celular seca. Además la composición en lípidos neutros de las microalgas también cambian de una especie a otra, donde algunas son más ricas que otras.²⁸

La composición y el perfil de los ácidos grasos de los lípidos extraídos varía según el ciclo de vida de las microalgas y las condiciones del medio de cultivo, como la composición del medio, intensidad de iluminación, relación luz/oscuridad, aireación y agitación. Algunas microalgas se ha aumentado su contenido de lípidos de 10 % peso seco a casi el 20 % con la privación del oxígeno.²⁸

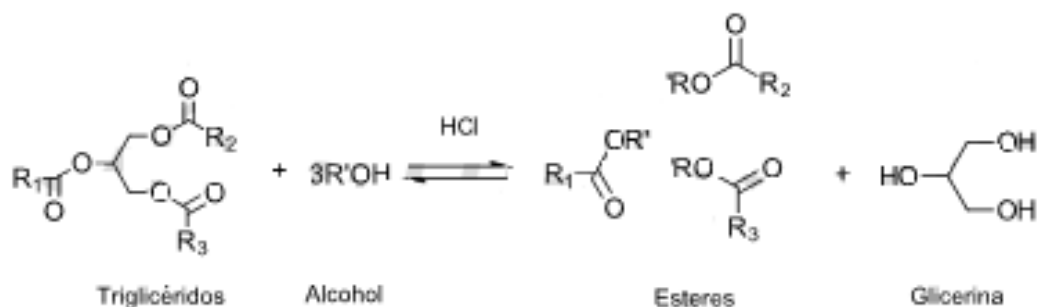
Las microalgas poseen alcanos los cuales tienen un alto valor calorífico y baja viscosidad, también producen lípidos neutros que comprenden principalmente los triglicéridos, en donde hay mayor generación en condiciones de ausencia completa de nutrientes. La composición de lípidos totales en el aceite de microalga es de lípidos neutros, pigmentos, fosfolípidos y glicolípidos. Pero los lípidos neutros son considerados como el mejor sustrato para la generación de FAAE, ya que se pueden ser fácilmente transesterificados.²⁹

Varios estudios se han realizado con diferentes especies de microalgas para evaluar el potencial de acumulación de ácidos grasos y la productividad de la biomasa. El contenido de aceite más alto se encuentra en la especie *Botryococcus braunii* (25–75) % pero su productividad es baja. Una especie con bastante potencial es *C. pitschmannii* porque puede alcanzar un contenido lípidico de hasta el 51 % (peso seco) en comparación con *C. vulgaris* que es del 26 % (peso seco), donde su rendimiento es de (11–14) %.²⁹

2.1.6. Producción de biodiesel a partir de microalgas

El biodiesel es la mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos obtenidos por transesterificación de aceites vegetales o grasas animales.²¹ Reaccionan con alcoholes de cadena corta en presencia de un catalizador y se obtiene una mezcla de ésteres y glicerol como se puede ver en la Figura 4.³⁰

Figura 4. Reacción de transesterificación de los triglicéridos con alcohol



FUENTE: Autor

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1. Aplicaciones de sistemas de cultivo a gran escala

Las microalgas han despertado un gran interés por parte de la sociedad científica debido a su gran potencial para la producción de biodiesel, por esta razón se han realizado varios experimentos para mejorar esta producción. Un estudio que se realizó fue la asociación de la microalga *Chlorella vulgaris* con la bacteria *Azospirillum brasilense* para la eliminación de nitrógeno y fósforo en el tratamiento de aguas residuales,³¹ donde tiene una eficiencia de 70 % para el nitrógeno y 28 % para el fósforo.²⁰ Otro ensayo, fue la asociación con diferentes bacterias como la *Flavobacteria*, *Terrimonas* y la *Sphingobacteria*, en donde se dedujo el papel del pH y los floclulantes en el crecimiento de los cultivos de la *Chlorella vulgaris*.³² Además se pueden cultivar de manera fotoautótrofa, fotoheterótrofa, heterótrofa o en condiciones de mixotrofia, en donde la manera que resulta económicamente rentable y técnicamente viable es la producción fotoautótrofa.

Desde 1950 se ha venido empleando los cultivos en estanques de Raceway para la producción comercial de las microalgas, donde la planta de producción de biomasa más grande ocupa una superficie de 400 000 m².²⁶ Estos estanques eran utilizados para el tratamiento de aguas residuales pero no estaban diseñados para la optimizar la actividad de la microal-

ga.³³ Por este motivo se diseñó un estanque de algas de alta velocidad (HRAPs) que usan una rodadura y las aguas residuales circulan suavemente, su profundidad va de (0,2–1,0) m con alto contenido de nitrógeno y fósforo de las aguas residuales, permitiendo proliferar a las microalgas con concentraciones de más de 3 g/m³. Una gran ventaja es la mezcla vertical que aumenta el crecimiento de las microalgas, debido a la exposición frecuente de las células a la luz, previene la sedimentación de las microalgas/flóculos bacterianos y mejora la difusión de los nutrientes a través de la capa límite que rodea la célula. Pero su aplicación a gran escala no se ha podido elaborar, ya que absorción de luz y la fotosíntesis son limitados en los HRAPs³⁴ y el contenido lipídico en estos sistemas es de (10–30) % debido a que contiene una mezcla de bacterias y algas, en donde el contenido lipídico de las bacterias es menor al 10 % , siendo una desventaja potencial para su utilización para la producción de biocombustibles.³⁵

Otra tecnología de cultivo de algas son los sistemas cerrados que surgieron para solucionar la problemática de la contaminación por agentes externos y el aumento de temperatura de los sistemas abiertos. Un tipo de este sistema, son los fotobiorreactores tubulares en donde ha empezado a aplicar con el fin de explorar miles de especies fotosintéticas, creando de esta forma el “Módulo de crecimiento Mera” (MGM) que desde 1997 ha duplicado su tamaño. Este módulo fue diseñado por la empresa *Mera Pharmaceuticals* y es controlado por un computador, además tiene incorporado métodos patentados para controlar el pH, la temperatura y los niveles de nutrientes para optimizar las tasas de crecimiento. También usa una potente turbulencia que proporciona la mezcla adecuada de los nutrientes y elimina el efecto sombreado que limita a los fotobiorreactores cerrados. El MGM permite el crecimiento continuo y la cosecha de microalgas durante unos meses, reduciendo el tiempo de inactividad para el sistema contribuyendo a su eficacia, obteniendo como resultado la astaxantina como suplemento nutricional, donde tiene numerosos efectos beneficiosos y por ende un costo alto (superior a 70 000 dólares por kilogramo al por menor).³⁶

Otra aplicación de fotobiorreactores es en Klotze, Alemania, en donde la construcción a gran escala de microalgas comenzó en 1999 y un año más tarde se cultivó *Chlorella vulgaris*, en donde son cultivadas en un sistema de vidrio con 500 Km de longitud y en un invernadero que cubre más de 1,2 ha. Esta tecnología tiene muchas ventajas, como su exposición a la luz solar óptima, no existe contaminación externa, el alga recolectada no necesita esterilización previa y después del secado el polvo se puede consumir inmediatamente, o procesarse adicionalmente.³⁷

También existen cultivos fotótrofos que son particularmente prometedores, debido a que puede absorber el CO₂ de los gases de combustión provenientes de las fábricas y convertirlo en combustible, se hace uso de la luz solar como fuente de energía y carbono inorgánico como fuente de carbono. El contenido lipídico de las microalgas varía de un (5–68) % dependiendo de la especie, en donde la mayor productividad lipídica hasta la fecha, era de 179 mg L⁻¹ d⁻¹ por *Chlorella sp.*, utilizando aireación con 2,0 % (v/v) de CO₂ y cuando se compara con otros cultivos, la contaminación es menor.¹⁸

La utilización de cultivos heterótrofos a gran escala con una superficie de 7500 m fabrica 10 000 toneladas de biodiesel al año. Estos cultivos han presentado inconvenientes a nivel

de inversión, ya que los costes de fabricación son más grandes que los cultivos de soja, pero evita problemas sociales y económicos con relación a la materia prima.³⁸

2.2.2. Cultivo de microalgas a pequeña escala

Actualmente existen investigaciones que tratan de la depuración de agua residual mediante el cultivo de microalgas, ya que su capacidad de asimilación de nutrientes como fósforo y nitrógeno. Por este motivo, la mayoría de los estudios realizados se basan en el uso de las microalgas como tratamiento terciario de las aguas. Un estudio fue la evaluación del crecimiento de *Chlorella* en agua residual de cuatro puntos de su proceso de tratamiento: previa y después la decantación primaria, tras el tratamiento de fangos activos y el sobrenadante de la centrífuga de fangos. Su estudio proporcionó datos de velocidades específicas de crecimiento desde $0,34\text{ d}^{-1}$ tras fangos activos hasta $0,95\text{ d}^{-1}$ para el sobrenadante y de eliminación de nutrientes y DQO. Otra investigación realizada es la producción de biomasa y la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana tras su segundo tratamiento mediante el cultivo de *Neochloris oleoabundans*, obteniendo una concentración de biomasa de 2100 mg L^{-1} , una producción de 233 g/L d y una eliminación de $218\text{ mg de NO}_3^-/\text{L}$ y $47\text{ mg de PO}_4^{3-}/\text{L}$.³⁹

2.2.3. Extracción de aceites a partir de biomasa de microalgas

Cuando se produzca la biomasa necesaria se puede obtener el aceite mediante distintos métodos, que pueden mostrar un valor agregado que permita aprovechar a lo máximo sus subproductos para la producción de biocombustibles, como el biodiesel. Una de estas tecnologías verdes de la química sostenible para el medio ambiente es el ultrasonido, que es una técnica ampliamente utilizada en procesos químicos de aguas, industrias de colorantes, alimentos e industria farmacéutica para extraer compuestos bioactivos como aceites esenciales, flavonoides, alcaloides, polisacáridos, ésteres, entre otros. En la Tabla 4 se puede observar el rendimiento en la extracción del aceite de la microalga *Nannochloropsis oculata* usando una mezcla de solventes: cloroformo–metanol mostrando su mayor rendimiento a los 45 minutos de sonicación y a una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero también es posible considerar suficiente 10 minutos para sonicación donde reduce el tiempo de extracción y el costo.⁴⁰

Tabla 4. Rendimientos de extracción de aceites de las microalgas *Nannochloropsis oculata*⁴⁰

Muestras de microalgas (g)	Tiempo de sonicación (min)	Temperatura de extracción ($^{\circ}\text{C}$)	Rendimiento aceite (%)
2,01	10	48	$33,90 \pm 2,01$
2,03	20	45	$33,59 \pm 2,18$
2,03	30	48	$34,87 \pm 2,73$

... continúa en la siguiente página

Tabla 4. . . continuación

Muestras de microalgas (g)	Tiempo de sonicación (min)	Temperatura de extracción (°C)	Rendimiento aceite (%)
2,02	45	50	35,55±2,05

2.2.4. Desactivación de lipasas

Un estudio realizado con las microalgas de especie *Chlorella salina* para la producción de biodiesel a través de la interesterificación y su reacción de biocatálisis fue realizada con células enteras de *Rhodotorula mucilaginosa* produciendo la enzima lipasa que fue inmovilizada por el bagazo de la caña de azúcar. El costo de esta enzima en la generación de biodiesel afecta en general la economía de producción y por este motivo debe ser mitigado. En este estudio, el efecto del catalizador es absorbido por el bagazo de caña de azúcar con una área de superficie de 1,785 m²/g, mostró su mayor rendimiento en 1,5 g en la reacción interesterificación en un intervalo de de (0,5–2,5) g de biocatalizador utilizado.⁴¹

2.2.5. Otras aplicaciones de las microalgas

Las microalgas como microorganismos generadores de biocombustibles de origen vegetal almacenan la energía solar de manera química y para su producción es necesario tener en cuenta la productividad, es decir la selección de cepas, la eficiencia fotosintética, la productividad de los lípidos, los costos de de producción y recolección.²⁰

Una aplicación de algunas especies de microalgas se dirige hacía el consumo humano, donde la biomasa se comercializa en formas de tableta o en polvo como aditivos alimentarios generalmente en el mercado de alimentos saludables. Las microalgas más utilizadas son las especies de *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*, donde en el 2003 se registró una producción de *Chlorella* con gran valor nutricional y alto contenido proteico, también tiene valor medicinal como la protección contra la insuficiencia renal, la *D. Salina* tiene una producción anual de 1200 toneladas y es explotada por su alto contenido en β -caroteno.²⁰

Otro uso de las microalgas es como alimento para la acuicultura, ya que poseen grandes cantidades de carbohidratos, proteínas útiles, lípidos y antioxidantes convirtiéndolo en un alimento esencial en la cría de todas las etapas de los moluscos bivalvos marinos (almejas, ostras), los estadios larvales de algunos gasterópodos marinos (caracol), larvas de peces marinos y camarones peneidos. Además producen omega - 3 y omega - 6, esenciales para la nutrición humana, los precios de los productos de pescado han ido aumentando provocando la búsqueda de alternativas para estos ácidos grasos, en donde la producción a escala comercial de microalgas y utilizando su biomasa como alternativa viable para la harina y aceite de pescado en la acuicultura reduciendo tanto el coste como el impacto ecológico de la piscicultura intensiva.⁴²

La biomasa de microalgas contiene altas concentraciones de lípidos, proteínas y vitaminas y además de ser una alternativa valiosa a los tratamientos convencionales de purificación la biomasa puede reciclarse o utilizarse como fertilizante para el alimento del ganado. También sus condiciones fotosintéticas permite que el oxígeno sea liberado, mejorando así el potencial de auto - depuración del agua. En los países agrícolas, la biomasa de algas se utiliza directamente en la inoculación del suelo para aumentar las productividades de los cultivos, ya que en la India se encontró una mejora significativa en los cultivos de arroz que crecen en suelos enmendados con biofertilizante de algas verdeazuladas.⁴³

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. EQUIPOS

Se utilizó centrifuga Thermo Scientific (Gemmy), balanza analítica OHAUS , ultrasonido Elmasonic E15H, rotovaporador Heidolph, microscopio Olympus, manta de calentamiento y agitación radleys, cámara Neubauer BOECO Germany, equipo infrarrojo Shimadzu IRAffinity-1.

3.2. REACTIVOS Y MATERIALES

- ✓ KH_2PO_4 – Merck – 99,5 %
- ✓ K_2HPO_4 – Carlo Erba – 98 %
- ✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – Merck – 99 %
- ✓ NaCl – Merck – 99,5 %
- ✓ $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – Carlo Erba – 99,5 %
- ✓ Vitamina B1 – Genfar – 300 mg
- ✓ H_3BO_3 – Merck – 99,5 %
- ✓ $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – Merck – 98 %
- ✓ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – Merck – 99,5 %
- ✓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ – Panreac – 99 %
- ✓ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – Merck – 98 %
- ✓ $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ – Carlo Erba – 99 %
- ✓ $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ – Merck – 85 %
- ✓ MeOH – J.T.Baker – 99,9 %
- ✓ Hexano – J.T.Baker – 99,7 %
- ✓ HCl – Merck – 37 %

3.3. MANTENIMIENTO DEL INÓCULO DE *Chlorella vulgaris*

Las microalgas se cultivaron en un fotobiorreactor alimentado con luz artificial (Figura 5) en las instalaciones de la Universidad Santo Tomás, sede finca El Limonal, Piedecuesta a partir de una cepa obtenida por un trabajo de grado anteriormente realizado.⁴⁴

Figura 5. Fotobiorreactor del inóculo de las microalgas especie *Chlorella vulgaris*



FUENTE: Autor

3.4. PRETRATAMIENTO DEL AGUA

El pretratamiento del agua se realizó usando un acondicionador de acuarios marca ANTI-CLORO con el fin de reducir el cloro residual y sus compuestos activos oxidantes, estableciendo las condiciones adecuadas para el crecimiento de las microalgas.⁴⁵

3.5. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo que se utilizó fue el Medio Basal de Bold modificado, en donde se adecuó para convertirlo en un medio para cultivo mixotrófico con la adición de la glicerina como fuente de carbono orgánico. La composición del medio se ve reflejada en la Tabla 5 y se aforó a 1 L.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo

Componente	Solución base
KH_2PO_4	1,4 g

... continúa en la siguiente página

Tabla 5... continuación

Componente	Solución base
K_2HPO_4	0,6 g
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	50 mg
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,6 g
NaCl	50 mg
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	6 mg
Vitamina B1	0,02 mg
Solución A5 ⁴⁶ *	2,0 mL
Úrea - $CO(NH_2)_2$	1,5 g
Glicerina - $C_3H_8O_3$	57 mL

* La composición de la Solución A5 se encuentra en el Anexo 1

3.6. DISEÑO FOTOBIORREACTOR

Se realizó un diseño especial para el proyecto como se muestra en la Figura 6. Se utilizaron 4 botellones de plástico cada uno con capacidad de 20 L, obteniéndose en total 80 L de cultivo de microalgas. Se usaron 4 lámparas de luz blanca fluorescente como fuente de iluminación (Lámpara electrónica 1x20W, AC 110 – 130V, 50/60Hz). Como fuente de aire se usó una bomba para acuario (capacidad de 70 L/min), esta a su vez aseguró el movimiento algal.⁴⁷ El cultivo de microalgas mediante este diseño especial se realizó por triplicado para dar validez a sus resultados.

Figura 6. Fotobiorreactor en funcionamiento

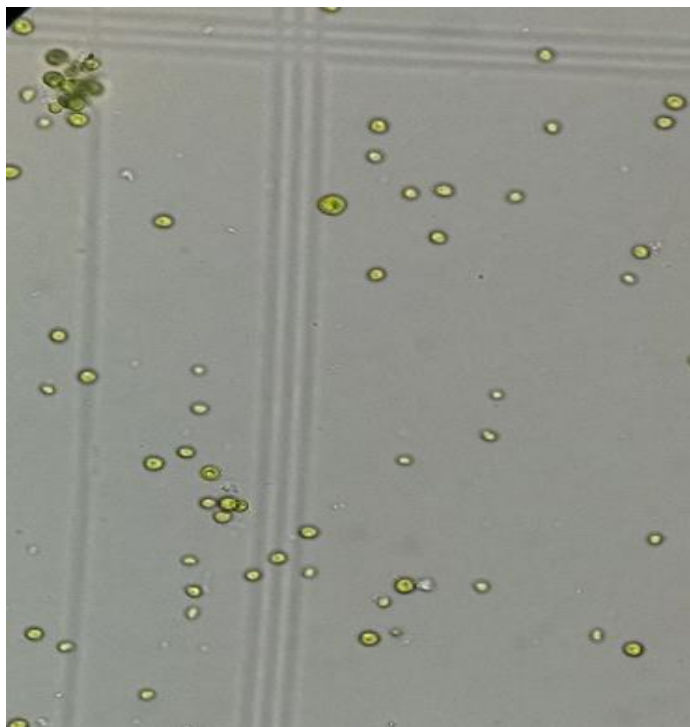


FUENTE: Autor

3.7. CONTEO CELULAR DE LAS MICROALGAS

Se realizó un conteo celular por medio de cámara Neubauer para observar el crecimiento celular de las microalgas. Se tomó 1 mL de muestra de cada botellón se llevó a las instalaciones de la universidad, seguidamente se tomaron 20 μL y se dispuso en la cámara. Se realizó el conteo en patrón de zigzag con un aumento de 40X del microscopio marca Olympus como se da a conocer en la Figura 7, se anotó el número de células y se lavó la cámara. Este procedimiento se llevó a cabo diariamente durante 14 días.

Figura 7. Microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* en microscopio 40X



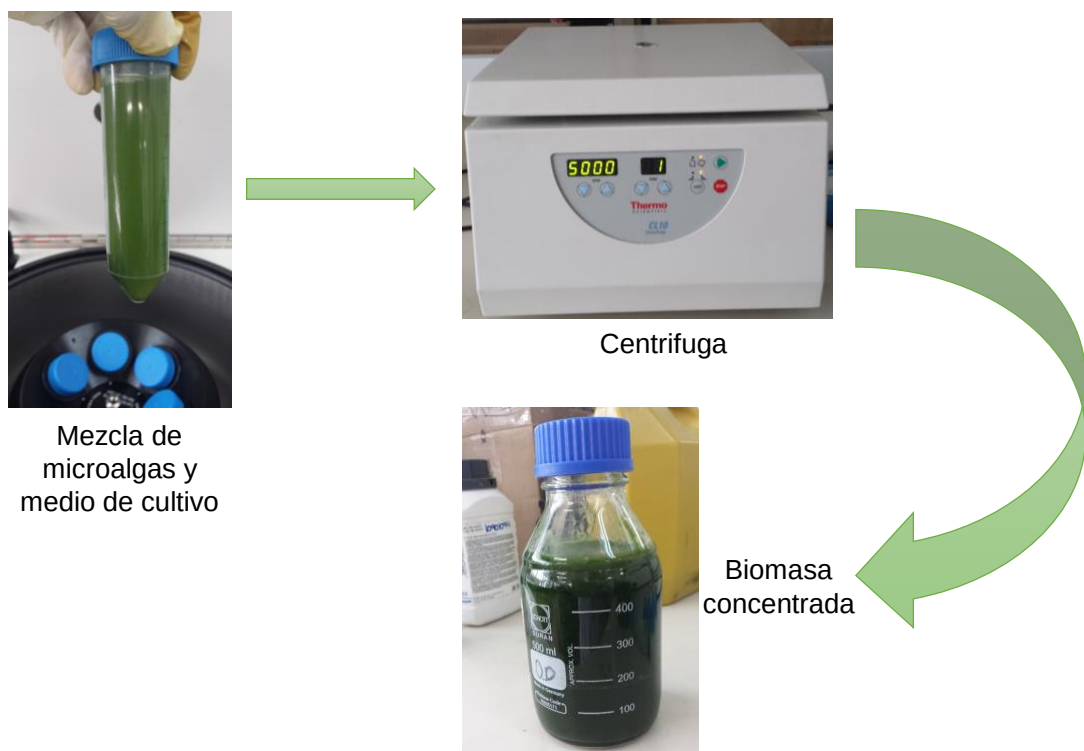
FUENTE: Autor

3.8. OBTENCIÓN BIOMASA

Al terminar su ciclo de crecimiento se le adicionó a cada botellón 0,5 g del conservante 2,6-di-terc-butil-4-(hidroxietil)fenol (BHT) para evitar degradamiento lipídico.

Para la obtención de la biomasa se le adicionó ALGUICIDA HICLOR SUPER CONCENTRANTE para su precipitación. Se extrajo la biomasa precipitada y se llevó a centrifugar durante 2 minutos a 5000 rpm con el fin de separarla del medio. A continuación en la Figura 8 se puede observar el resumen del procedimiento para la obtención de la biomasa.

Figura 8. Concentración de biomasa de las microalgas de especie *Chlorella vulgaris*



FUENTE: Autor

Luego la biomasa centrifugada se llevó a liofilización, en las instalaciones de Guatiguara de la Universidad Industrial con el fin de preservar la muestra. La biomasa liofilizada se muestra en la Figura 9.⁴⁸

Figura 9. Liofilización de la biomasa de las microalgas de especie *Chlorella vulgaris*



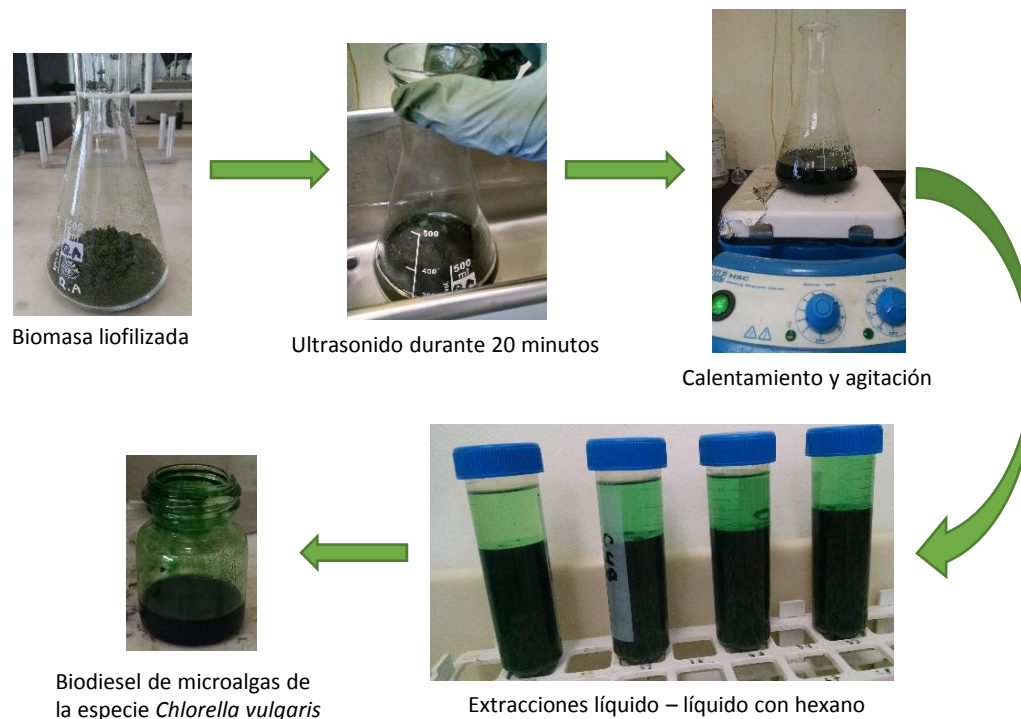
FUENTE: Autor

3.9. TRANSESTERIFICACIÓN DIRECTA CON CATALIZADOR ÁCIDO DE LA BIOMASA DE MICROALGAS

- ✓ **Solución 1,0 M de metanol y ácido clorhídrico:** se mezclaron 88,8 mL de HCl concentrado (37 % p/p) con 900 mL de metanol y se aforó a un litro con agua destilada.

Se pesó 34,73 g de biomasa microalgal liofilizada y se dispuso en un matraz y se le adicionaron 219 mL de la solución preparada anteriormente (solución 1,0 M MeOH – HCl), se llevó a sonicar durante 20 minutos. Luego se calentó a 65 °C durante 30 minutos con agitación continua para homogenizar la muestra. Se realizaron 6 extracciones líquido – líquido con hexano en porciones de 10 mL. Las extracciones se realizaron de la siguiente manera: primero se agitaban en vortex, después se centrifugaba durante 1 minuto a 5000 rpm y se extraía el sobrenadante. Finalmente el extracto obtenido se filtró con filtros de HPLC y fue llevado a rotovaporar para eliminar el solvente residual y obtener el biodiesel. El resumen del procedimiento se muestra en la Figura 10.

Figura 10. Transesterificación directa de la biomasa microalgal



FUENTE: Autor

3.10. CARACTERIZACIÓN DEL BIODIESEL

3.10.1. Análisis FT – IR

El espectro infrarrojo se obtuvo usando un espectrómetro infrarrojo Shimadzu IRAffinity – 1, modo ATR, el espectro con un rango de $(4000-420) \text{ cm}^{-1}$. La muestra se encontraba en estado líquido.

3.10.2. Análisis de RMN¹H

El espectro ¹H se registró en un espectrómetro de RMN Bruker Avance DRX400 400MHz. Se diluyó la muestra (aproximadamente 20 mg) en 0,5 mL de cloroformo deuterado CDCl₃.

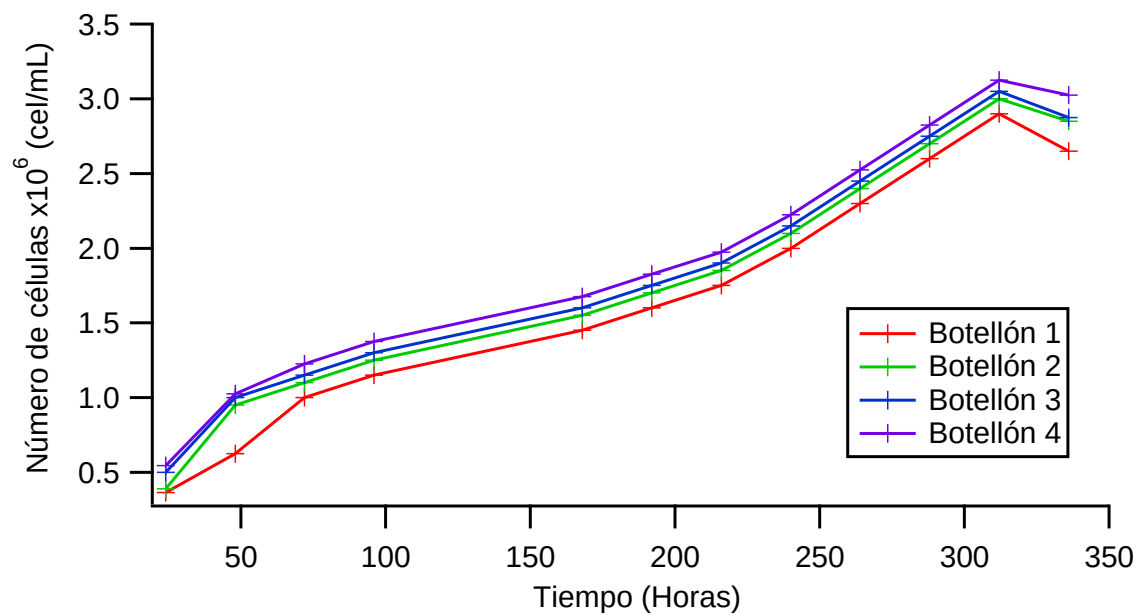
3.10.3. Análisis GC – FID

Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC) AT 6890N equipado con detector de ionización de llama (FID) y una columna [50 %–cianopropil-poli–(metilsiloxano) de 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm], el modo de inyección fue “split”, volumen de inyección 2 μL y el patrón utilizado fue una mezcla de 37 compuestos FAMES (Anexo 2 y 3).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

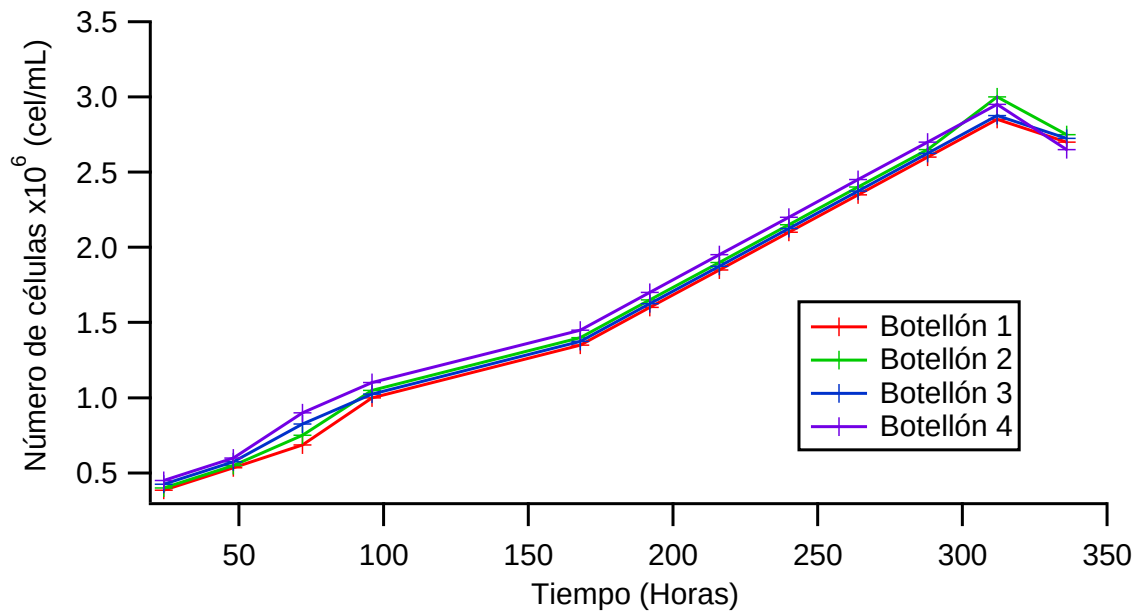
4.1. Crecimiento microalgal

Figura 11. Curva de crecimiento del experimento uno



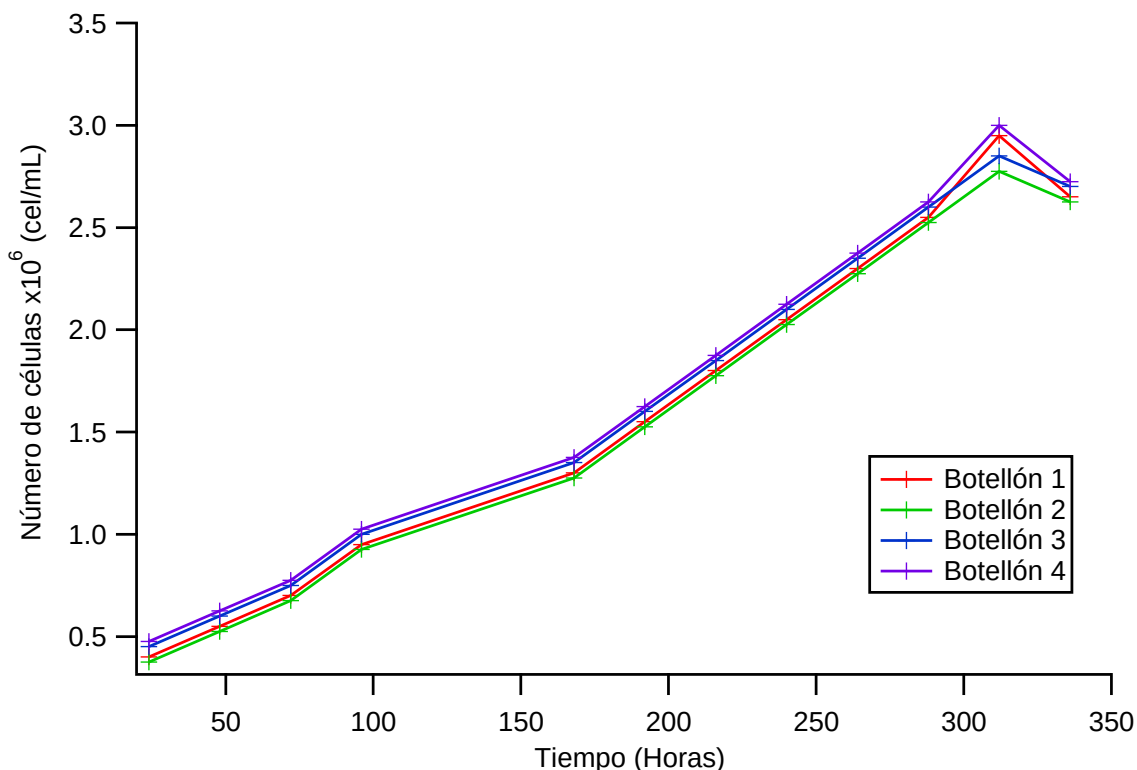
FUENTE: Autor

Figura 12. Curva de crecimiento del experimento dos



FUENTE: Autor

Figura 13. Curva de crecimiento del experimento tres



FUENTE: Autor

En la Figura 11, Figura 12 y Figura 13 se observan las curvas de crecimiento celular de las microalgas durante sus 14 días, en la Sede El Limonal, Piedecuesta. En el experimento uno (Figura 11) el punto máximo de crecimiento fue entre 2 650 000 – 3 125 000 cel/mL y el mínimo fue entre 365 000 – 450 000 cel/mL, el experimento dos (Figura 12) su punto máximo de crecimiento fue entre 2 700 000 – 3 000 000 cel/mL y mínimo fue entre 385 000 – 475 000 cel/mL y el experimento tres (Figura 13) su punto máximo de crecimiento fue entre 2 650 000 – 3 000 000 cel/mL y mínimo fue entre 375 000 – 475 000 cel/mL.

El cultivo de microalgas al ser enriquecido con fuentes alternas de carbono como la glicerina, puede acelerar el crecimiento de flora microbiana asociada al detrimento de las microalgas, debido a la competencia interespecifica que se establecería entre ambos microorganismos.⁴⁹ Por esta razón en el caso del experimento 1 (Figura 11) se puede ver variaciones entre los botellones.

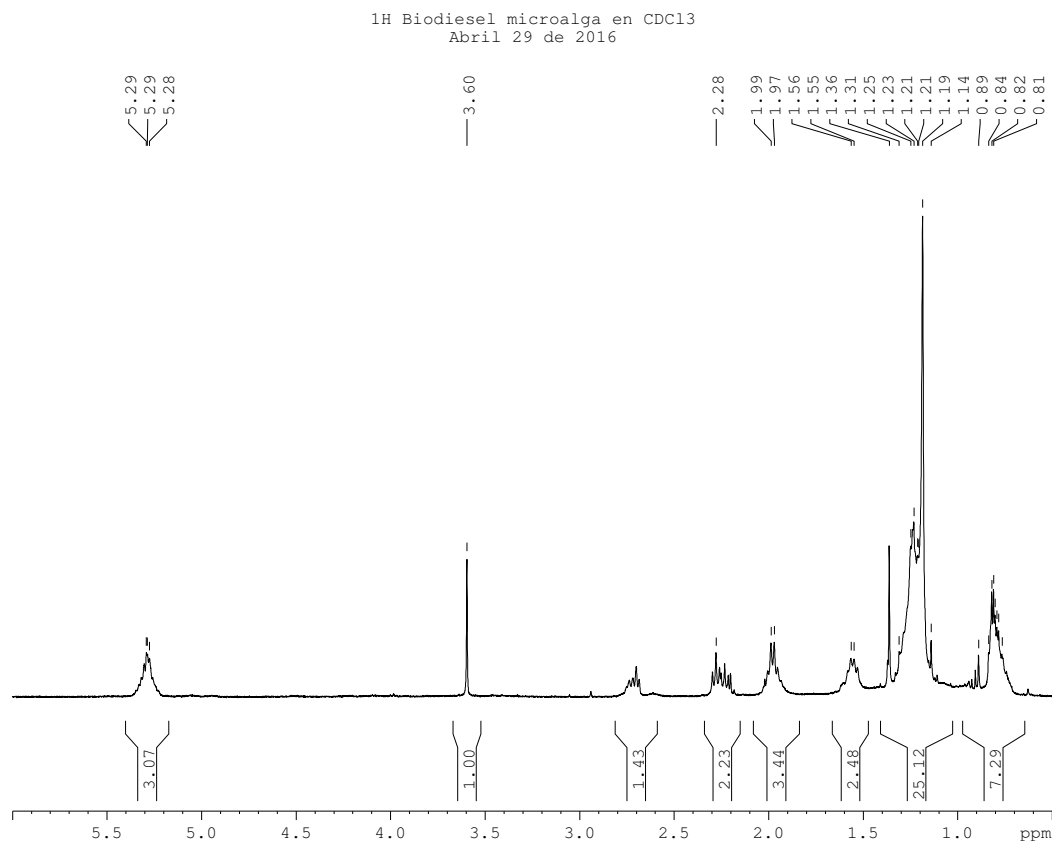
También se considera que la relación carbono/nitrógeno influyen en el contenido de lípidos de las células, ya que en la literatura se ha reportado que al limitar la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo podría cambiar el contenido lipídico y aumentar la proporción de algunos ácidos grasos.⁵⁰

4.2. Producción de biodiesel de microalgas

De 46 botellones cultivados en este proyecto se obtuvo un total de 2,3 L de biomasa concentrada de donde se obtuvieron 81,87 g de biomasa liofilizada de los cuales se transestereificaron 34,73 g obteniéndose un total de 2,58 g de biodiesel con un rendimiento de 7,43 %.

La utilización de la liofilización para la conservación de la biomasa es más efectiva, ya que elimina completamente el agua sin afectar la composición de las microalgas, conservando su color y contenido lipídico. Su extracción es más fácil debido a la ausencia total de agua en comparación con el secado por horno que se puede perder muestra en el papel filtro o pueden quedar residuos de papel y afectar los resultados.

Figura 14. Espectro de RMN¹H biodiesel microalga en CDCl₃

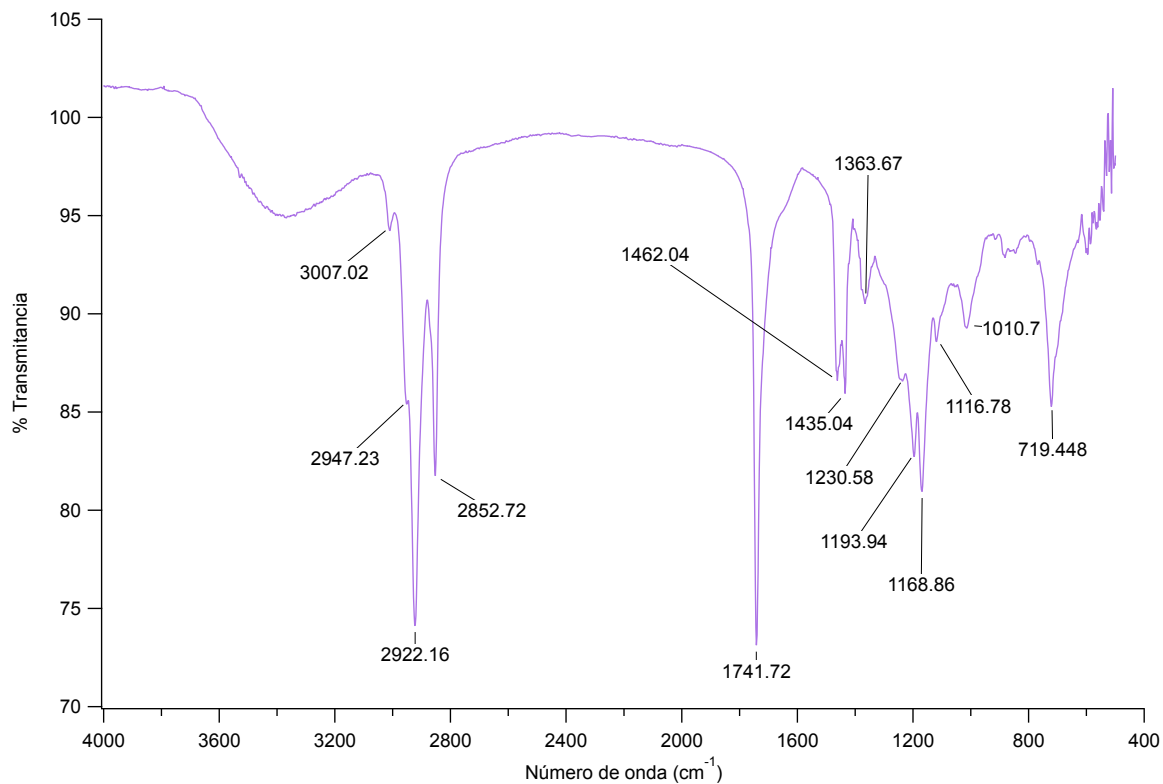


FUENTE: Autor

El espectro RMN ¹H de biodiesel de microalgas, se presenta en la Figura 14. La señal ancha de 5,8 – 5,9 ppm corresponde a los protones olefinicos (–CH=CH–), el singlete a 3,6 ppm corresponde a los grupos metoxi de los metil ésteres del biodiesel. La señal de los protones alílicos de los ácidos grasos insaturados (ej. ácido linoléico) se encuentra en 2,28 ppm,

los protones α a los carbonilos de los ésteres ($-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{Me}$) se encuentran en la señal ancha de 1,99 – 1,97 ppm, los protones β – al carbonilo de los ésteres ($-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CO}_2\text{Me}$) aparecen en la señal de 1,56 – 1,55 ppm, también las señales 1,36 – 1,14 ppm se deben a los protones de los metilenos de la cadena larga principal del ácido graso y las señales de los protones de los metilos terminales ($\text{C}-\text{CH}_3$) se encuentran en 0,89 – 0,81 ppm.⁵¹

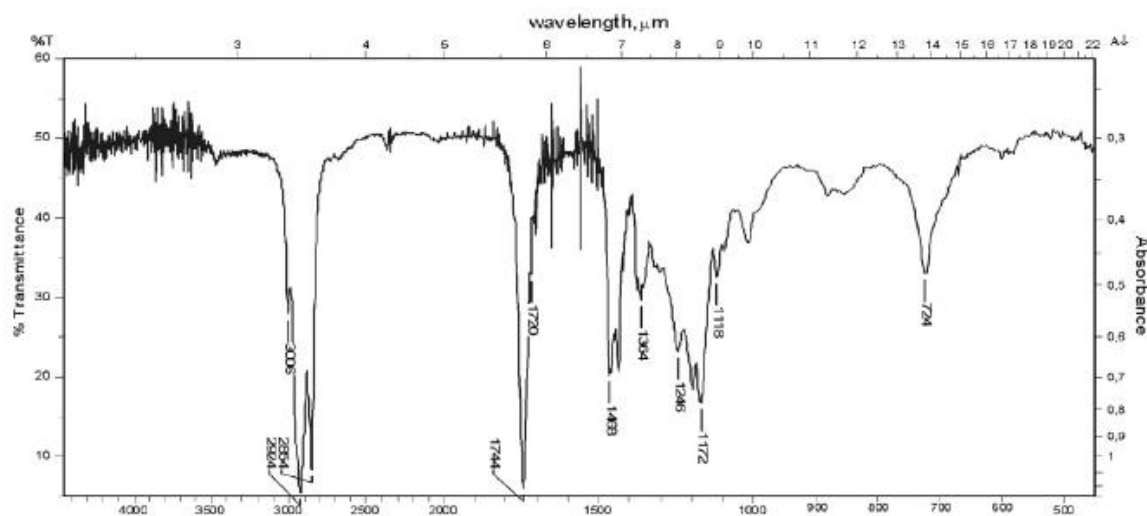
Figura 15. Espectro IR biodiesel microalga



FUENTE: Autor

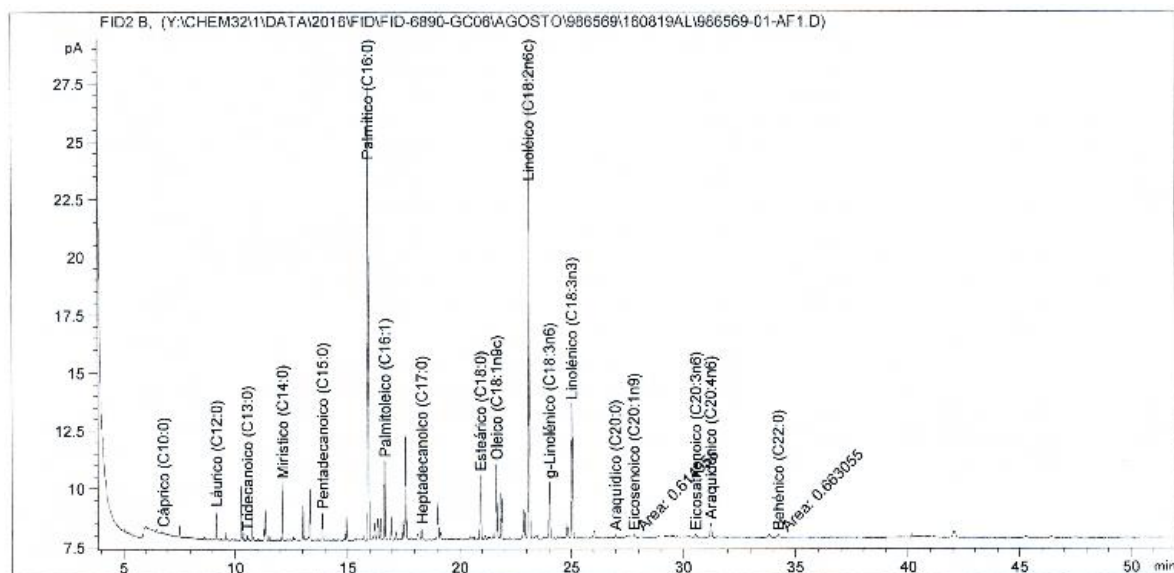
En la Figura 15 se presenta el espectro FTIR de la muestra transesterificada. La absorción en 3007 cm^{-1} corresponde a la tensión C-H de los protones vinílicos de los ácidos grasos insaturados. Las absorciones en el rango $(2850-2950)\text{ cm}^{-1}$ corresponden a las tensiones C-H de los metilos y los metilenos alifáticos. La banda de absorción en $1741,72\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento del grupo carbonilo de ester, la banda de 1462 cm^{-1} se deriva de la deformación angular simétrica del enlace C-H de metilenos $(-\text{CH}_2-)_n$. La banda cerca a 1365 cm^{-1} corresponde a la deformación angular simétrica del enlace C-H del CH_3 terminal, el pico cerca de 1170 cm^{-1} se debe al estiramiento del enlace C-O-C y la banda cerca a 720 cm^{-1} es relativa a la deformación asimétrica de los grupos de enlace C-H de los grupos metilenos $(-\text{CH}_2-)_n$. Todas estas señales según la literatura son consistentes a las que se esperan para los ésteres metílicos de ácidos grasos como se muestra en la Figura 16.⁵¹

Figura 16. Espectro IR biodiesel *Caryocar brasiliense* Camb.



FUENTE: Literatura⁵²

Figura 17. Perfil de los metil ésteres de ácidos grasos del biodiesel de microalga



FUENTE: Autor

La composición de ésteres metílicos de ácidos grasos determina las propiedades del biodiesel, debido a las características químicas de los ácidos grasos como la longitud de cadena de carbono y el grado de insaturación.⁵³ En la Tabla 6 se representan el perfil lipídico del biodiesel de las microalgas de especie *Chlorella vulgaris* (Anexo 4 y 5).

Tabla 6. Perfil de los metil ésteres de los ácidos grasos (% total de FAMES)(ácidos saturados e insaturados)

Ácidos Grasos	%	Nombre
C10:0	0,73	Ácido Cáprico
C12:0	0,94	Ácido Láurico
C13:0	0,20	Ácido Tridecanoico
C14:0	2,40	Ácido Mirístico
C15:0	1,23	Ácido Pentadecanoico
C16:0	24,86	Ácido Palmítico
C16:1	4,58	Ácido Palmitoleico
C17:0	0,80	Ácido Heptadecanoico
C18:0	4,33	Ácido Esteárico
C18:1n9c	5,69	Ácido Oleico
C18:2n6c	37,11	Ácido Linoléico
C18:2n6	4,22	Ácido g-Linoléico
C18:3n3	10,68	Ácido Linolénico
C20:0	0,27	Ácido Araquídico
C20:1n9	0,28	Ácido Eicosenoico
C20:3n6	0,28	Ácido Eicosatrienoico
C20:4n6	1,34	Ácido Araquidónico
C22:0	0,30	Ácido Behénico

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos insaturados más importantes en la composición de las microalgas son el ácido palmitoleico, oleico y linoléico y ácidos grasos saturados como el palmítico, que según los datos registrados en la literatura estos fueron reconocidos como los ácidos grasos más comunes contenidos en los lípidos de microalgas.⁵³ Además en condiciones mixotróficas el biodiesel de microalgas de especie *Chlorella vulgaris* presentó un perfil lipídico (Figura 17) compuesto principalmente por ácido linoléico (37,11 %), ácido palmítico (24,86 %) y ácido linolénico (10,68 %). Además según la literatura la disminución del contenido de CO₂ mejora la producción de ácidos grasos con mayor grado de insaturación, como es el caso del ácido linoléico.⁵⁴

Cabe resaltar que es poco probable que los metil ésteres de cadena de carbonos impar se produzcan biológicamente. Pernet et al. reporta la presencia de ácido tridecanoico (C13:0), pentadecanoico (C15:0) y heptadecanoico (C17:0) en tejidos de bivalvos marinos.⁵⁵ Igualmente Pozhidaev et al. reporta la presencia de ácido pentadecanoico (C15:0) y heptadecanoico (C17:0) en el biodiesel producido a partir de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*.⁵⁶ Francisco et al. demuestra la presencia de los ácidos pentadecanoico (31,81 %), tridecanoico (0,65 %) y heptadecanoico (3,9 %) en biodiesel de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*.⁵⁷

5. CONCLUSIONES

Del cultivo mixotrófico de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* se obtuvo 2,58 g de biodiesel con un rendimiento de 7,4 %. El biodiesel obtenido se caracterizó mediante cromatografía de gases con detector de llamas (GC–FID) mostrando la presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados como son ácido linoléico y linolénico y ácidos grasos saturados como el palmítico. Además los métodos de transesterificación tradicionales según reporta la literatura tienen un tiempo de reacción de más de 180 minutos,⁵⁸ mientras que la transesterificación directa en medio ácido tuvo un tiempo de reacción de 65 minutos siendo una opción viable para la obtención de biodiesel a partir de microalgas.

En cuanto al rendimiento hay que tener en cuenta que *Chlorella vulgaris* no es la cepa de mayor viabilidad para la obtención de biodiesel de microalgas ya que su rendimiento fue del 7,43 % y es un porcentaje bajo en comparación con otros cultivos energéticos como el de la palma africana (*Elais guineensis* Jacq.) con un rendimiento del 40,3 %.⁵⁹ Pero se recomienda realizar estudios en otras especies de microalgas.

Se mejoró el tiempo de extracción de la biomasa microalgal adicionándole BHT y un alguicida comercial evitando la descomposición de la biomasa, también la centrifugación es el método de separación celular del medio de cultivo más eficiente. Se recomienda investigar la reutilización del medio de cultivo y es necesario realizar análisis fisicoquímicos para evaluar que la calidad del agua sea la adecuada para el crecimiento microalgal.

6. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Se realizó una ponencia en el Séptimo Simposio Internacional de Biocombustibles, 2016, Club Campestre Cañaveral, Floridablanca, Santander.

Se publicó en el libro Educación, Transformación social, Innovación y Emprendimiento. BEP-MA 12 años. p. 107 – 108 (Figura 18).

Figura 18. Publicación de resultados de biodiesel de microalgas



FUENTE: Autor

BIBLIOGRAFÍA

1. Anónimo Biofuels., <http://www.alternative-energy-news.info/technology/biofuels/> (visitado 2016).
2. Kirrolia, A.; Bishnoi, N. R. y Singh, R. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2013**, *20*, 642-656.
3. Walker, N., *Biomass Fueling Change*; Crabtree Publishing Company: 2007, págs. 5 -10.
4. KG, R. K.G. C. Cultivation of Algae in Photobioreactor., <http://www.oilgae.com/algae/cult/pbr/pbr.html> (visitado 2016).
5. Oetjen, G. W., *Freeze - Drying*; Wiley - VCH: 1999, pág. 2.
6. Suganya, T.; Varman, M.; Masjuki, H. y Renganathan, S. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2016**, *55*, 909 -941.
7. Demirbas, A., *Biodiesel: A realistic Fuel Alternative for Diesel Engines*; Springer: 2008, págs. 111 -119.
8. Castellar Grey Angulo, E. y Cardozo, B. *Prospect.* **2014**, *12*, 90 -104.
9. Sawin, J. L. y Sverrisson, F. *Renewables 2014 – Global Status Report.*; 2014.
10. Mandotra, S.; Kumar, P.; Suseela, M. y Ramteke, P. *Bioresour. Technol.* **2014**, *156*, 42 -47.
11. Heredia-Arroyo, T.; Wei, W.; Ruan, R. y Hu, B. *Biomass Bioenerg.* **2011**, *35*, 2245-2253.
12. Mata, T. M.; Martins, A. A. y Caetano, N. S. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2010**, *14*, 217-232.
13. Schoepp, N. G.; Stewart, R. L.; Sun, V.; Quigley, A. J.; Mendola, D.; Mayfield, S. P. y Burkart, M. D. *Bioresour. Technol.* **2014**, *166*, 273-281.
14. Gao, F.; Yang, Z.-H.; Li, C.; Wang, Y.-j.; Jin, W.-h. y Deng, Y.-b. *Bioresour. Technol.* **2014**, *167*, 441 -446.
15. Maity, J. P.; Bundschuh, J.; Chen, C.-Y. y Bhattacharya, P. *Energy* **2014**, *1* -10.
16. Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P.-Y. y Vaca-Garcia, C. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2014**, *35*, 265-278.
17. Rawat, I.; Ranjith Kumar, R.; Mutanda, T. y Bux, F. *Appl. Energ.* **2013**, *103*, 444-467.
18. Amaro, H. M.; Guedes, A. C. y Malcata, F. X. *Appl. Energ.* **2011**, *88*, 3402-3410.
19. Ursu, A.-V.; Marcati, A.; Sayd, T.; Sante-Lhoutellier, V.; Djelveh, G. y Michaud, P. *Biore-sour. Technol.* **2014**, *157*, 134-139.
20. Brennan, L. y Owende, P. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2010**, *14*, 557-577.
21. Suali, E. y Sarbatly, R. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2012**, *16*, 4316-4342.
22. Ketheesan, B. y Nirmalakhandan, N. *Bioresour. Technol.* **2012**, *108*, 196-202.
23. Saeid, A. y Chojnacka, K. *Chem. Eng. Res. Des.* **2014**, *1* -15.
24. Mitra, D.; van Leeuwen, J. H. y Lamsal, B. *Algal Res.* **2012**, *1*, 40 -48.
25. Ebrahimian, A.; Kariminia, H.-R. y Vosoughi, M. *Renew. Energ.* **2014**, *71*, 502-508.

26. Chisti, Y. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 294 -306.
27. Serrano, L. M. Estudio de cuatro cepas nativas de microalga para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel., Tesis de mtría., Universidad Nacional de Colombia, 2012, págs. 1 -141.
28. Halim, R.; Danquah, M. K. y Webley, P. A. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 709 -732.
29. Singh, B.; Guldhe, A.; Rawat, I. y Bux, F. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2014**, *29*, 216 -245.
30. Skorupskaite, V.; Makareviciene, V. y Gumbyte, M. *Fuel Process. Technol.* **2016**, *150*, 78 -87.
31. De Bashan, L. E.; Moreno, M.; Hernandez, J.-P. y Bashan, Y. *Water Res.* **2002**, *36*, 2941-2948.
32. Widjaja, A.; Chien, C.-C. y Ju, Y.-H. *J Taiwan Inst Chem Eng* **2009**, *40*, 13-20.
33. Muñoz, R. y Guieysse, B. *Water Res.* **2006**, *40*, 2799 -2815.
34. Sutherland, D. L.; Howard-Williams, C.; Turnbull, M. H.; Broady, P. A. y Craggs, R. J. *Bioresour. Technol.* **2014**, *1* -8.
35. Mehrabadi, A.; Craggs, R. y Farid, M. M. *Bioresour. Technol.* **2014**, *1* -13.
36. Mera, P. The Science and Technology of Microalgae Cultivation., <https://www.merapharma.com/research-and-development> (visitado 2016).
37. ALGOMED, <http://www.algomed.de/index.php?lang=eng&op=algenfarm>.
38. Tabernero, A.; del Valle, E. M. M. y Galán, M. A. *Biochem. Eng. J.* **2012**, *63*, 104 -115.
39. Martinez, A. R. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente., Tesis de mtría., Universidad Politécnica de Valencia, 2011, págs. 1 -93.
40. Fuentes M y Aranda, M *Revista del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas* **2013**, *34* -37.
41. Surendhiran, D.; Vijay, M. y Sirajunnisa, A. R. *J. Environ. Chem. Eng.* **2014**, *2*, 1294 -1300.
42. Taelman, S.; Meester, S. D.; Roef, L.; Michiels, M. y Dewulf, J. *Bioresour. Technol.* **2013**, *150*, 513 -522.
43. Wuang, S. C.; Khin, M. C.; Chua, P. Q. D. y Luo, Y. D. *Algal Res.* **2016**, *15*, 59 -64.
44. Díaz, Y. O. USO DE LA FLUORESCENCIA COMO PIGMENTO FOTOSINTÉTICO AUXILIAR EN EL CULTIVO DE MICROALGAS DE LA ESPECIE *Chlorella vulgaris*., Tesis de mtría., Universidad Santo Tomás, 2014, págs. 1 -57.
45. Porta, L. Aqua Med., <http://www.laboratorioporta.com.ar/pdf/AQUAMED2012.pdf> (visitado 2016).
46. Holm-Hansen O., G. G.C.S. F. *Physiol. Planta.* **1954**, *7*, 665 -675.
47. Ardila, L. Medición de la capacidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* para la remoción de cromo de aguas de curtiembre., Tesis de mtría., Universidad Nacional, 2012, págs. 1 -209.

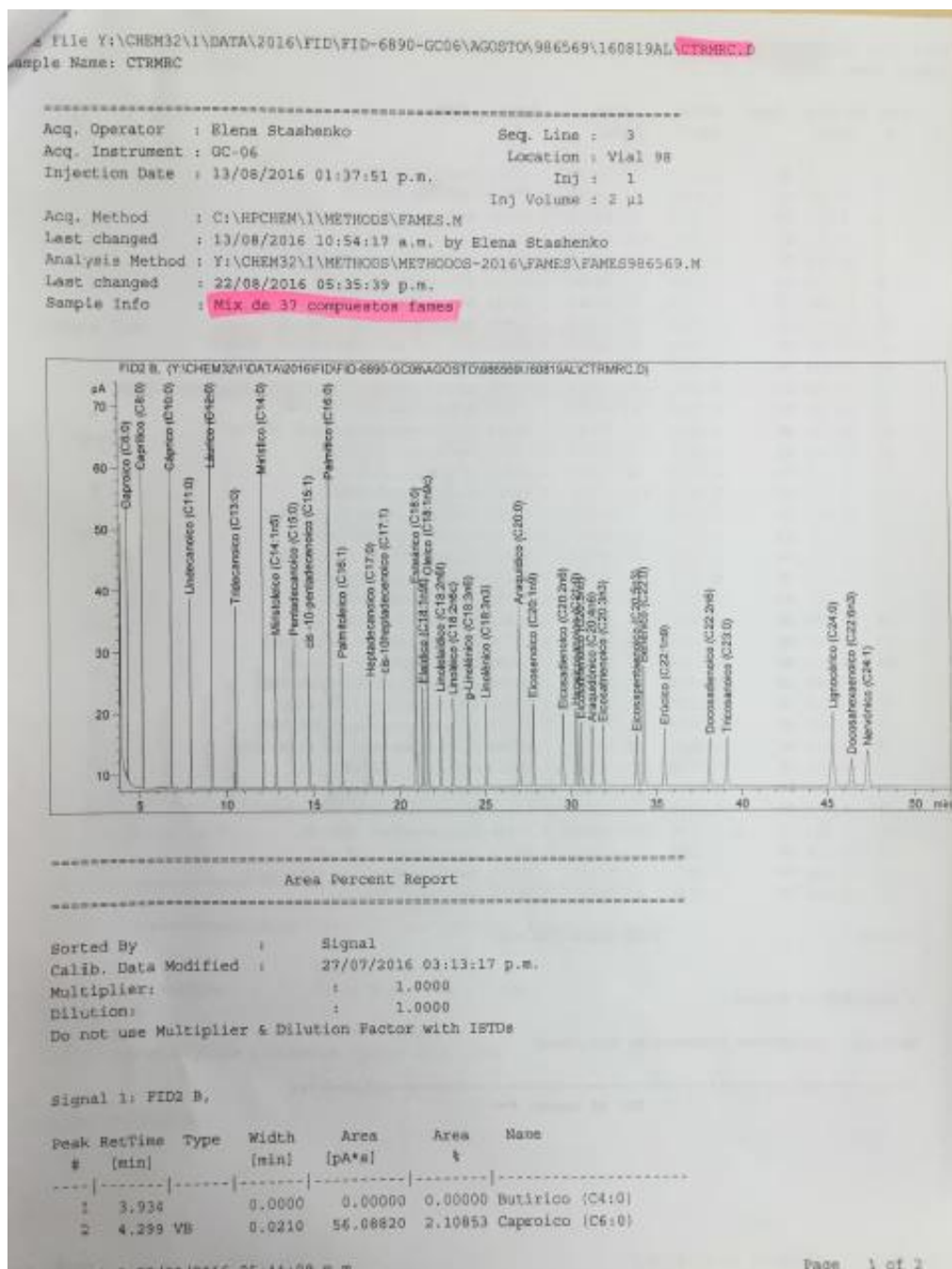
48. Taher, H.; Al-Zuhair, S.; Al-Marzouqi, A. H.; Haik, Y.; Farid, M. y Tariq, S. *J. Supercrit. Fluids* **2014**, *86*, 57 -66.
49. Ortega J.; Moronta, R. y Morales, E. *Ciencia* **2004**, *12*, 25 -31.
50. Perez-Garcia O.; de-Bashan, L. H. J. y Bashan, Y. *J. Phycol* **2010**, *46*, 800 -812.
51. Basumatary S.; Barua, P. y Chandra, D. *J. Chem. Pharm. Res.* **2013**, *5*, 172 -179.
52. Silva, T. A.; de Assunção, R. M. N.; Vieira, A. T.; de Oliveira, M. F. y Batista, A. C. F. *Fuel* **2014**, *136*, 10 -18.
53. Mahmoud, E. A.; Farahat, L. A.; Aziz, Z. K. A.; Fatthallah, N. A. y Din, R. A.S. E. *Egypt. J. Pet.* **2015**, *24*, EJPE:Special Issue, 97 -101.
54. Arias Martha; Martinez, A. y Cañizares, R. *Acta Biológica Colombiana* **2013**.
55. Pernet, F.; Pelletier, C. J. y Milley, J. *J. Chromatogr.* **2006**, *1137*, 127 -137.
56. Pozhidaev V., S. Y.G.K.B.G.G.P.B. A. y Vasilov, R. *J. Anal. Chem.* **2016**, *71*, 624 -629.
57. Francisco E., N. B.J.-L. E. y Francoa, T. *J Chem Technol Biotechnol* **2010**, *85*, 395-403.
58. Lemoes, J. S.; Sobrinho, R. C. A.; Farias, S. P.; de Moura, R. R.; Primel, E. G.; Abreu, P. C.; Martins, A. F. y DOca, M. G. M. *Sustainable Chem. Pharm.* **2016**, *3*, 33 -38.
59. Sambanthamurthi, R.; Oo, K.-C. y Ong, A. S. *Plant Science* **1987**, *51*, 97 -103.

ANEXOS

Anexo 1. Composición solución A₅

Componente	Solución base
H ₃ BO ₃	286 mg
MnSO ₄ · 7 H ₂ O	250 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	22,2 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	7,9 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,1 mg
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	6 mg
Agua destilada	100 mL

Anexo 2. Mezcla de 37 compuestos de FAMES



FUENTE: Autor

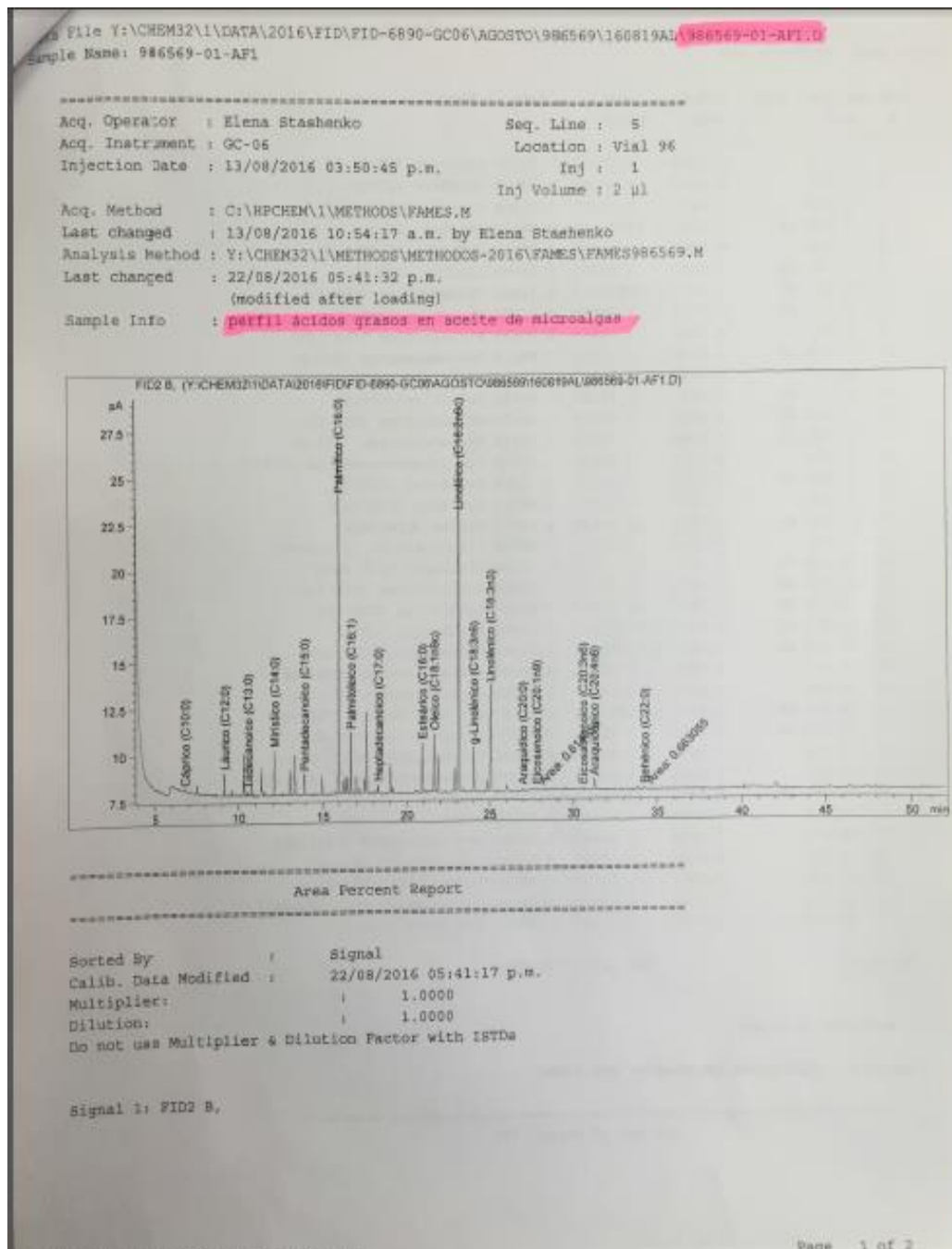
Anexo 3. Datos adicionales de la mezcla estandarizada

Data File Y:\CHEM32\1\DATA\2016\FID\FID-6890-GC06\AGOSTO\986569\160819A1\CTRMRC.D
Sample Name: CTRMRC

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
3	5.162	BB	0.0222	75.23778	2.82842	Caprilico (C8:0)
4	6.802	BB	0.0265	97.73565	3.67419	Caprico (C10:0)
5	7.917	BB	0.0254	51.82763	1.94836	Undecanoico (C11:0)
6	9.165	BB	0.0282	108.84676	4.09189	Láurico (C12:0)
7	10.844	BB	0.0305	56.83711	2.13668	Tridecanoico (C13:0)
8	12.114	BB	0.0334	117.08360	4.40154	Mirístico (C14:0)
9	12.840	BB	0.0373	57.21551	2.15091	Miristoleico (C14:1n5)
10	13.902	BB	0.0384	59.31915	2.23999	Pentadecanoico (C15:0)
11	14.759	BB	0.0401	57.43600	2.15920	cis-10-pentadecenoico (C15:1)
12	15.972	BB	0.0467	177.99875	6.69153	Palmitico (C16:0)
13	16.680	BB	0.0460	60.38486	2.27006	Palmitoleico (C16:1)
14	18.310	BB	0.0522	57.86168	2.17520	Heptadecanoico (C17:0)
15	19.136	BB	0.0525	59.93543	2.25316	cis-10-heptadecenoico (C17:1)
16	20.965	BB	0.0620	124.02156	4.66236	Estearico (C18:0)
17	21.386	BB	0.0590	60.75839	2.28410	Elaidico (C18:1n9t)
18	21.676	BB	0.0592	120.81058	4.54164	Óleico (C18:1n9c)
19	22.404	BB	0.0599	56.96246	2.14140	Linolealídico (C18:2n6t)
20	23.131	BB	0.0607	55.89811	2.10138	Linoleico (C18:2n6c)
21	24.022	BB	0.0614	53.19237	1.99967	g-Linolénico (C18:3n6)
22	25.043	BB	0.0578	52.79488	1.98472	Linolénico (C18:3n3)
23	27.002	BB	0.0634	124.32750	4.67386	Araquídico (C20:0)
24	27.828	BB	0.0671	61.39792	2.30814	Eicosenoico (C20:1n9)
25	29.549	BB	0.0726	56.54702	2.12578	Eicosadienoico (C20:2n5)
26	30.314	BB	0.0753	62.51329	2.35007	Heneicosanoico (C21:0)
27	30.580	BB	0.0748	51.00879	1.91758	Eicosatrienoico (C20:3n6)
28	31.243	BB	0.0737	49.21436	1.85012	Araquidónico (C20:4n6)
29	31.871	BB	0.0804	51.74270	1.94517	Eicosatrienoico (C20:3n3)
30	33.822	BB	0.0911	48.11679	1.80886	Eicosapentanoico (C20:5n3)
31	34.251	BB	0.0799	125.42278	4.71503	Behénico (C22:0)
32	35.454	BB	0.0970	61.55150	2.31391	Erúcico (C22:1n9)
33	38.105	BB	0.0972	56.77620	2.13439	Docosadienoico (C22:2n6)
34	39.132	BB	0.1134	63.68826	2.39424	Tricosanoico (C23:0)
35	45.376	BB	0.1383	123.47282	4.64173	Lignocérico (C24:0)
36	46.442	BB	0.1247	44.07841	1.65704	Docosahexanoico (C22:6n3)
37	47.359	BB	0.1297	61.95663	2.32914	Nervónico (C24:1)
Totals :				2660.06148	100.0000	
1 Warnings or Errors :						
Warning : Calibrated compound(s) not found						
*** End of Report ***						

FUENTE: Autor

Anexo 4. Perfil de ácidos grasos de biodiesel de microalgas



FUENTE: Autor

Anexo 5. Datos adicionales del % de área de cada ácido graso de la mezcla

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	3.934		0.0000	0.00000	0.00000	Butírico (C4:0)
2	4.306		0.0000	0.00000	0.00000	Caproico (C6:0)
3	5.170		0.0000	0.00000	0.00000	Caprílico (C8:0)
4	6.798	BB	0.0281	1.59504e-1	0.05278	Cáprico (C10:0)
5	7.924		0.0000	0.00000	0.00000	Undecanoico (C11:0)
6	9.162	BB	0.0280	2.06389	0.68290	Láurico (C12:0)
7	10.542	BV	0.0279	4.39918e-1	0.14556	Tridecanoico (C13:0)
8	12.107	BB	0.0329	5.21649	1.72604	Mirístico (C14:0)
9	12.841		0.0000	0.00000	0.00000	Miristoleico (C14:1n5)
10	13.898	BB	0.0378	2.67232	0.88422	Pentadecanoico (C15:0)
11	14.757		0.0000	0.00000	0.00000	cis -10-pentadecenoico (C15:1)
12	15.960	BB	0.0447	54.06325	17.88850	Palmitico (C16:0)
13	16.674	BB	0.0467	9.95897	3.29523	Palmitoleico (C16:1)
14	18.304	BB	0.0549	1.73602	0.57442	Heptadecanoico (C17:0)
15	19.290		0.0000	0.00000	0.00000	cis-10heptadecenoico (C17:1)
16	20.945	BB	0.0523	9.41510	3.11528	Estearico (C18:0)
17	21.374		0.0000	0.00000	0.00000	Elaídico (C18:1n9t)
18	21.658	BB	0.0611	12.37834	4.09576	Oleico (C18:1n9c)
19	22.393		0.0000	0.00000	0.00000	Linolelaídico (C18:2n6t)
20	23.134	VB	0.0631	80.70372	26.70332	Linoléico (C18:2n6c)
21	24.016	BB	0.0590	9.17155	3.03469	g-Linolénico (C18:3n6)
22	25.041	BB	0.0648	23.21393	7.68105	Linolénico (C18:3n3)
23	26.975	BB	0.0670	5.87548e-1	0.19441	Araquídico (C20:0)
24	27.806	MM	0.0867	6.14955e-1	0.20348	Eicosenoico (C20:1n9)
25	29.533		0.0000	0.00000	0.00000	Eicosadienoico (C20:2n6)
26	30.288		0.0000	0.00000	0.00000	Heneicosanoico (C21:0)
27	30.568	BB	0.0684	5.81096e-1	0.19227	Eicosatrienoico (C20:3n6)
28	31.236	BB	0.0751	2.90761	0.96207	Araquidónico (C20:4n6)
29	31.851		0.0000	0.00000	0.00000	Eicosatrienoico (C20:3n3)
30	33.809		0.0000	0.00000	0.00000	Eicosapentaenoico (C20:5n3)
31	34.217	MM	0.0982	6.63055e-1	0.21939	Behénico (C22:0)
32	35.444		0.0000	0.00000	0.00000	Erúico (C22:1n9)
33	38.075		0.0000	0.00000	0.00000	Docosadienoico (C22:2n6)
34	39.097		0.0000	0.00000	0.00000	Tricosanoico (C23:0)
35	45.325		0.0000	0.00000	0.00000	Lignocérico (C24:0)
36	46.424		0.0000	0.00000	0.00000	Docosahexaenoico (C22:6n3)
37	47.342		0.0000	0.00000	0.00000	Nervónico (C24:1)

FUENTE: Autor