

Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura

**VIABILIDAD DE UNA CEPA DE NANNOCHLORIS SP. DEL CEPARIO DE LA FOPCA
PARA LA OBTENCIÓN DE BIODISEL**

Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Pesquero Acuicultor

AUTOR

De Lellis Lacerna, Camilo Angelo

ASESOR

Ing. Figueroa Vargas Machuca, Manuel

JURADO

Dr. Moreno Garro, Víctor Raul

Ing. Mogollón Avila, Santos Valentín

Ing. Blas Ramos, Walter Eduardo

Mg. Aldave Palacios, Gladis Josefina

Lima-Perú

2018

Dedicatoria

Dedico mi tesis a Dios por permitirme alcanzar este logro, a mi madre Rosa Angélica Alvarado por sus consejos y apoyo, también a mi padre Miguel Camilo De Lellis Lacerna por su motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero ante todo el amor incondicional de ellos. A mi hermano Piero De Lellis Lacerna por su confianza hacia mi persona, a mi abuelo Miguel De Lellis por sus conocimientos brindados para mi investigación y sin olvidar a mi perro Kira que me da tanto amor sin pedir nada a cambio.

A mis amigos queridos por el apoyo brindado durante tantos años y a mi enamorada Andrea por su apoyo, animo brindado hasta el final de la culminación de mi carrera, día a día.

Camilo Angelo De Lellis Lacerna

Agradecimientos

Dejo constancia de mi sincero agradecimiento al Ingeniero Manuel Eduardo Figueroa Vargas Machuca, asesor de mi tesis, por su valiosa orientación, paciencia y apoyo brindado, durante el periodo de desarrollo de la presente investigación.

Al personal del laboratorio de Cultivos Menores de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura el Bachiller Collin Rivera Reyes, también al técnico Daniel Neciosup Gonzales del laboratorio de Contaminación Ambiental y Recursos Marinos de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura por el apoyo, ánimo y asesoría en la realización de mi tesis.

Agradezco también al Ingeniero Blass por compartir sus conocimientos y sugerencias en la elaboración de la parte estadística de esta tesis.

A los profesores de la Facultad por servirme de guías intelectuales durante mi vida universitaria. Haciendo mención a los ingenieros Jorge Herrera Cruz, Víctor Moreno Garro, Valentín Mogollón y el Doctor Ingeniero Pedro José Rodenas Seytuque.

El Autor

Índice

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO	ii
INDICE.....	iii
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURA.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUCCIÓN	1
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.1 Planteamiento del Problema	2
1.2 Formulario del Problema	3
1.3 Objetivos	3
1.4 Hipótesis	3
1.5 Justificación	4
1.6 Antecedentes	4
II. MARCO TEORICO	13
2.1 Historia del Biodiesel	13
2.2 Métodos alternativos sustentables o sostenibles energéticos.....	13
2.3 Fuentes de energía renovables sostenibles	14
2.4. Biocombustibles	14
2.4.1 Generalidades	14
2.4.2 Clasificación de biocombustibles	15
2.4.3 Biodiesel	17
2.4.4 Potencial de los biocombustibles	18
2.5 Micro algas como fuente de Biocombustibles	19
2.5.1 Generalidades de las microalgas	20
2.5.2 Potencial de los biocombustibles de microalgas	20
2.5.3 Producción de biocombustibles de microalgas	21
2.6 Tecnologías para el cultivo de microalgas	23
2.7 Tecnologías para la cosecha de microalgas	23
2.8 Factores de productividad y de producción de biocombustibles de micrlagas	28
2.9 Reacción química del Biodiesel	29
2.9.1 Reacciones secundarios	30
2.10 Ley de Biocombustibles en Perú	30
III.MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1 Familia de alga estudiada	35
3.2 Control de condiciones que afectan el crecimiento en el cultivo de micralgas	36
3.3 Materiales utilizados para el control de las condiciones	36

3.4 Medio de cultivo	38
3.5 Procedimiento para el cultivo de microalgas	39
3.6 Procedimiento para el control de las condiciones de cultivo	39
3.7 Cosecha de biomasa	39
3.7.1 Sedimentación	40
3.7.2 Centrifugación	41
3.8 Pretratamiento de la biomasa algal	41
3.9 Secado al horno y trituración de la biomasa algal	41
3.10 Metodología de extracción de lípidos y protocolos de experimentación con microalgas	42
3.11 Materiales y procedimiento de extracción con el método Soxhlet	42
3.12 Proceso de extracción	43
3.13 Obtención de lípido algal	45
3.14 Recuperación del solvente	46
3.15 Separación del solvente del lípido algal	47
3.16 Cuantificación de lípido algal	48
IV. RESULTADOS	49
V. DISCUSIÓN	58
VI. CONCLUSIÓN	60
VII. RECOMENDACIONES.....	62
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	63

Lista de Tablas

Tabla 1: Diferentes contenidos de aceite en algunas especies de microalgas.

Tabla 2: Clasificación de Biocombustibles (Dragone et al 2009)

Tabla 3: Contenido de aceites en algunas microalgas (Chisti, 2007).

Tabla 4: Breve descripción sobre *Nannochloris* sp

Lista de Figuras

Figura 1: Proceso de obtención de biodiesel.

Figura 2: Reacción de transesterificación de aceite para obtener biodiesel (Martínez-Alcalá).

Figura 3: Proceso integrado de producción de biodiesel y bioetanol a partir de microalgas (Garibay et al.,2009).

Figura 4: Sistemas para producción de microalgas (a) Sistemas tipo circuito: tipo de sistema con paletas giratorias para la circulación del agua. (b) Fotobioreactores tubular (Bosnjakovic, 2013).

Figura 5: Equipo Soxhlet.

Figura 6: Reacción química del biodiesel.

Figura 7: Especie de microalga *Nannochloris* sp.

Figura 8: Materiales utilizados para el control de las condiciones. (a) Botellas de 7 litros. (b) Lámpara fluorescente. (c) Compresor de aire. (d) Cintas de pH. (e) Termómetro.

Figura 9: Componentes del medio de cultivo. (a) Vitaminas. (b) Silicatos. (c) Nitratos. (d) Fosfatos. (e) Trazas de metales.

Figura 10: Sedimentación. (a) Biomasa sedimentada.

Figura 11: Centrifugación. (a) Tubos de plástico o vidrio de diferentes dimensiones. (b) Separación de la microalga por centrifugación.

Figura 12: Pretratamiento de biomasa algal. (a) Biomasa algal colocada en el horno. (b) Biomasa sin contenido de agua.

Figura 13: Preparación del balón de ebullición. (a) Balón de ebullición vacío en la estufa. (b) Balón de ebullición vacío en el desecador.

Figura 14: Preparación del cartucho para la extracción. (a) Peso del cartucho con biomasa algal seca. (b) Colocación del cartucho en equipo Soxhlet.

Figura 15: Preparación del solvente. Colocación del solvente en el equipo Soxhlet.

Figura 16: Conexiones con las mangueras al equipo Soxhlet para mantener frío el condensador.

Figura 17: Equipo Soxhlet ensamblado ya con el balón de ebullición.

Figura 18: Obtención del lípido algal. (a) Lípidos extraídos mediante el solvente. (b) Balón de ebullición sin más lípido que extraer.

Figura 19: Recuperación del solvente.

Figura 20: Separación del solvente del lípido algal. (a) Secado en el horno del balón de ebullición con lípido algal. (b) Desecación del balón de ebullición con lípido algal

Resumen

Se estudió una microalga de origen marino llamada *Nannochloris* sp. bajo dos concentraciones diferentes de medio de cultivo Guillard f/2, la primera fue a una concentración normal de 1 ml de cada nutriente por litro y 0.5 ml de vitamina por cada litro a 4 botellas rotulados desde N-1 hasta N-4; la segunda se colocó bajo estrés a una concentración de 0.5 ml de cada nutriente por litro y 0.25 ml de vitamina por cada litro a 5 botellas rotuladas desde E-1 hasta E-5, luego se llevó a cabo el crecimiento de cultivo y su respectivo monitoreo tres veces por día hasta alcanzar la etapa estacionaria, para luego centrifugar y separar la fase líquida de la sólida, con la finalidad de secar la muestra sólida (biomasa algal) en una estufa a 38°C, todo esto fue llevado a cabo en el laboratorio de Cultivos Menores de la facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villareal.

La parte de la extracción de los lípidos tanto para las microalgas bajo estrés y las microalgas bajo condiciones normales se realizó con el método Soxhlet, utilizando como solvente al Hexano; se realizaron 14 extracciones (7 extracciones bajo condiciones normales de la microalga y 7 extracciones bajo condiciones de estrés de la microalga), esta etapa de la investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Contaminación Ambiental y Recursos Marinos de la misma facultad y Universidad mencionadas anteriormente.

La microalga *Nannochloris* sp demostró que al ser sometida bajo estrés genera un porcentaje de lípidos alto, lo cual la hace viable para la producción de biodiesel.

Palabras claves: *Nannochloris* sp., medio de cultivo Guillard f/2, biomasa algal, método Soxhlet.

Abstract

A microalga of marine origin called *Nannochloris* sp. under two different concentrations of Guillard culture medium f / 2, the first was at a normal concentration of 1 ml of each nutrient per liter and 0.5 ml of vitamin for each liter to 4 bottles labeled from N-1 to N-4; the second one was placed under stress at a concentration of 0.5 ml of each nutrient per liter and 0.25 ml of vitamin for each liter to 5 bottles labeled from E-1 to E-5, then the culture growth and its respective monitoring three times a day seven days a week, until reaching the stationary stage and then centrifuging and separating the liquid phase from the solid one, in order to dry the solid sample (algal biomass) in an oven at 38 ° C, all This was carried out in the laboratory of Minor Cultures of the Faculty of Oceanography, Fisheries, Food Sciences and Aquaculture of the National University Federico Villareal.

The part of the extraction of lipids for both microalgae under stress and microalgae under normal conditions was carried out with the Soxhlet method, using Hexane as a solvent; 14 extractions were performed (7 extractions under normal conditions of microalgae and 7 extractions under conditions of microalgae stress), this stage of the research was carried out in the laboratory of Environmental Pollution and Marine Resources of the same faculty and University mentioned previously.

Nannochloris sp microalga showed that when subjected to stress generates a high percentage of lipids, which makes it viable for the production of biodiesel.

Keywords: *Nannochloris* sp., Guillard culture medium f / 2, algal biomass, Soxhlet method.

Capítulo I: Introducción

El aumento del contenido de dióxido de carbono en nuestra atmósfera con la disminución de fuentes fósiles no renovables nos ha llevado a darle un gran interés en desarrollar fuentes renovables de energías (Halim, Danquah, & Webley, 2012). Este hecho nos exige encontrar opciones de energías que puedan ser desarrolladas en procesos sustentables, renovables y que no dañen el entorno en el que habitamos, además tengan la posibilidad de capturar CO₂ de la forma más eficiente. La fuente de energía más prometedora que ha dado buenos resultados en los últimos años son los biocombustibles. (Donohue & Codgell, 2006; Schenk *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009).

Microalgas con alto contenido de lípidos son consideradas como alternativas de biocombustibles muy eficientes, contribuyendo de forma prometedora en la fijación de dióxido de carbono y pudiendo ser utilizadas para elaborar una gran diversidad de biocombustibles, los más comunes son el bioetanol, biodiesel, biohidrógeno, los cuales pueden generar metabolitos de gran interés en la industria de farmacias, como suplementos nutritivos, la acuicultura, la industria de los cosméticos entre otros. (Rosenberg, *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008). Una alternativa altamente fiable es el biodiesel producido mediante transesterificación de lípidos extraídos de microalgas, con una huella de carbono neutral, siendo una tecnología que no compite con cultivos agrícolas tradicionales. Sin embargo, existe una alta variabilidad entre las especies de microalgas referente a su capacidad para sintetizar sustancias oleaginosas que depende en gran medida de las características ambientales y concentración de nutrientes en el medio que las sustenta (Abou-Shanab, Hwang, Cho, Min, & Jeon, 2011; Amaro, Guedes, & Malcata, 2011).

La tesis plantea como objetivo principal analizar el potencial aprovechamiento de los lípidos de *Nannochloris* sp. como biocombustibles con procedimientos gravimétricos; controlando los parámetros ambientales más importantes de la microalga en fotobioreactores.

Para la realización de la tesis se empleó la microalga *Nannochloris* sp. cepa procedente del laboratorio de Cultivos Menores de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villarreal. La extracción de lípidos se realizó con el ensayo Soxhlet dentro de la misma facultad.

Este proyecto representa una etapa inicial de investigación que permitirá establecer futuras líneas de investigación para aprovechar nuevas fuentes de energía renovable como es el biodiesel, producido mediante la extracción de lípidos de las microalgas.

1.1 Planteamiento del Problema

Actualmente la ONU y los países del primer mundo y las Naciones Emergentes están buscando como reducir los gases del efecto invernadero como es el CO₂ y el CH₄ estos gases están produciendo un calentamiento paulatino en la atmosfera terrestre, lo que causa un aumento observado del promedio anual de las temperaturas del aire y el océano, la fusión generalizada de nieve y hielo, el aumento del promedio mundial del nivel del mar, además el agotamiento inexorable de los combustibles fósiles y el encarecimiento de estos recursos, lo que ha exigido a los gobiernos a buscar alternativas amigables con el medioambiente sin éxito, como lo ha sido los biodiesel a base de plantas oleaginosas, alcoholes por fermentación de azúcares que solo pueden satisfacer una pequeña fracción de la demanda mundial.

La situación actual que afecta a nuestro país con respecto a encontrar alternativas eficientes y que ayuden a reducir las emisiones de gases invernaderos, es un tema a enfatizar con mayor rigurosidad en estos tiempos, es por eso que planteo realizar una investigación científica.

1.2 Formulación del Problema

¿En qué medida el contenido lipídico de *Nannochloris* sp. sirve para la producción de biodiesel para reducir los gases de efecto invernadero?

1.3 Objetivos

Objetivo General:

Determinar el contenido lipídico en la microalga *Nannochloris* sp. que sirve para la producción de biodiesel para reducir los gases de efecto invernadero.

Objetivo Específico:

Analizar y controlar los parámetros ambientales para el óptimo crecimiento de la microalga. Estudiar la productividad de lípidos con la microalga *Nannochloris* sp. cultivada bajo diferentes condiciones de nutrientes.

Comparar el porcentaje de lípidos entre las microalgas bajo diferentes condiciones de nutrientes y tiempo de cosecha de los cultivos.

Contribuir al conocimiento científico y práctico respecto de la microalga presente en fotobioreactores.

1.4 Hipótesis

Ha:

El contenido lipídico de *Nannochloris* sp. es significativamente para la producción de biodiesel para reducir los gases de efecto invernadero.

Ho:

El contenido lipídico de *Nannochloris* sp. no es significativamente para la producción de biodiesel para reducir los gases de efecto invernadero.

1.5 Justificación

El Perú es un país que recibe una alta radiación solar que favorece el proceso de fotosíntesis, tiene muchas ventajas para desarrollar biocombustibles a partir de microalgas tanto marinas como continentales. La masa de las microalgas marinas está compuesta entre un 45% y un 75% por aceites y lípidos, que representan potenciales recursos energéticos.

Debido a que los combustibles fósiles se están agotando rápidamente por el incremento de la población y las necesidades del petróleo en diversos ámbitos en nuestra vida cotidiana, las microalgas oleaginosas constituyen una nueva alternativa para la producción de biodiesel, por su alta eficiencia fotobiosintética de triglicéridos y presentan productividades mayores de 10 a 100 veces que los cultivos convencionales. Además que actúan como sumideros de CO₂ y pueden usar aguas servidas para producir biodiesel, siendo las microalgas una alternativa sostenible para obtención de dicho biocombustible, pero aún existen varios obstáculos tecnológicos y económicos que deben solucionarse y uno de los mayores retos es el aislamiento, selección y cultivo de microalgas robustas que presenten óptimo contenido de lípidos es por eso que deseo dejar un análisis completo del potencial lipídico de esta microalga cultivada en laboratorios.

1.6 Antecedentes

Panorama Histórico Mundial del Cultivo de Microalgas

Según Sánchez Varo (1996), el cultivo de microalgas y el uso práctico de su biomasa como fuente de algunos compuestos tienen su origen en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial. La industria de las microalgas comenzó en los años 60 con el desarrollo de los procesos de *Chlorella*, siguiendo en los años 70 con *Spirulina* (cianobacteria) y en los años 80 con *Dunaliella salina*. En las últimas décadas ha ocurrido un extraordinario avance en la investigación básica sobre la producción y utilización de algas pero el escepticismo ante la utilización de fuentes de proteína distintas a los convencionales, el alto costo de producción del cultivo de algas y los criterios de salubridad han dificultado su implantación como

complemento alimenticio en la nutrición humana, por lo que las investigaciones se han dirigido a la utilización de la biomasa de microalgas para otras aplicaciones como pienso para animales, fertilizantes, biodiesel, piensos para acuicultura, etc, además de ayudar a solventar problemas de salud pública mediante la purificación biológica de aguas residuales.

Iniciativas privadas surgieron en Europa, principalmente en Holanda y España, llegando a comercializar con éxito tanto aceite como biomasa de microalgas, además de vender la tecnología de cultivo a diversas empresas.

Según Sánchez Varo (1996), otros estudios han demostrado la potencialidad de las algas para producir una amplia gama de compuestos polisacáridos, lípidos, proteínas, pigmentos, vitaminas, esteroides, enzimas, antibióticos, productos químicos, biocombustibles (metanol y etanol), etc. La mayor parte de la biomasa de estas algas se comercializa como suplemento en algunas pastas, vino, cereales, etc. Se usan en sistemas de tratamiento de aguas pudiendo retirar metales pesados, macronutrientes, etc. Diversas microalgas son fundamentales en dietas acuícolas para los primeros estadios de moluscos bivalvos, camarones, langostinos y peces. Suelen usarse para cultivar invertebrados acuáticos como la pulga de agua, artemia salina, entre otros, siendo utilizados como alimento primario en cualquier granja acuícola intensiva (Sánchez Varo, 1996).

Según Sheehan et al., (1998), el área de Energías del gobierno norteamericano patrocinó durante los años setenta hasta los años noventa proyectos para obtener energías perdurables en el tiempo a base de diversos tipos de microalgas. La meta de estos financiamientos, llamado Programa De Especies Acuáticas, fue elaborar biocombustibles a base de microalgas con un gran porcentaje de lípidos, sembradas en grandes piscinas de concreto al intemperie adicionando dióxido de carbono proveniente de las industrias que utilizaban el carbón como medio de energía. Los resultados arrojaron 300 microalgas con un contenido de aceite y fosfolípido elevado; como conclusión no se recomendó ninguna especie como la más adecuada de acuerdo a su contenido de lípidos, lo que si se reportó fue el rendimiento de estas microalgas en cuanto a la producción de lípidos

para una futura industria de biodiesel la cual era 200 veces más productiva que los cultivos convencionales de plantas oleaginosas para la industria de biodiesel.

Luego de diversos estudios con microalgas de origen marino y continental se han obtenido resultados prometedores debido a su alto contenido de lípidos (Chisti, 2007), identificando especies prometedoras como *Chlorella* (Liu et al., 2008; Xiong et al., 2008), *Dunaliella* (Takagi et al., 2006), *Nannochloris* (Takagi et al., 2000) y *Botryococcus braunii* (Li y Quin, 2005). De estas cuatro especies *Nannochloris* y *Dunaliella* son de origen marino siendo muy factibles su producción industrial en los mares.

La tabla 1: Porcentaje de aceite de microalgas marinas y continentales (Loera-Quezada y Olgún, 2010)

Especie	Contenido de aceite (% del peso seco)	Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Referencia
<i>Parietochoris incisa</i> (d)	60 ^a	NR	Solovchenko et al. (2008)
<i>Nannochloropsis</i> sp. (m)	60 ^a	204	Rodolfi et al. (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i> (d)	56 ^a	13.22	Gouveia et al. (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i> (d)	~42 ^a	12.77	Widjaja et al. (2009)
<i>Cryptocodinium cohnii</i> (m)	41.14 ^a	82	Mendoza et al. (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i> (d)	43 ^b	NR	Mandal y Mallick (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i> (d)	38 ^c	133	Li et al. (2008c)
<i>Nannochloropsis</i> sp. (m)	28.7 ^c	90	Gouveia y Oliveira (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i> (d)	27 ^c	127.2	Francisco et al (2010)
<i>Nannochloropsis oculata</i> (m)	30.7 ^c	151	Chiu et al. (2009)
<i>Dunaliella</i> (m)	67 ^c	33.5	Takagi et al. (2006)
<i>Choricystis minor</i> (d)	21.3 ^c	82	Mazzuca-Sobczuk y Chisti (2010)
<i>Chlorella protothecoides</i> (d)	50.3 ^d	NR	Xiong et al. (2008)
<i>Chlorella vulgaris</i> (d)	21 ^d	54	Liang et al (2009)
<i>Scenedesmus rubescens</i> (m)	73 ^e	NR	Matsunaga et al (2009)

^a Cultivo bajo supresión de nitrógeno; ^b Cultivo bajo deficiencia de nitrógeno; ^c Cultivo con suficiencia de nutrientes; ^d cultivo heterotrófico; ^e Ausencia de nutrientes. m = marina y d = dulceacuícola; NR = no reportado

Fuente: Loera-Quezada y Olgún, 2010

Según, Rodolfi et al., (2009), diversos científicos han estudiado más de 30 especies con la finalidad de elegir las más adecuadas según su perfil oleaginoso, identificando que *Nannochloropsis* sp., de origen marino, es muy prometedora para la elaborar los famosos biocombustibles. Por otra parte Gouveia y Oliveira (2009), estudiaron durante años 6 especies

de microalgas de origen marino y continental para identificarlas que tuvieran mejores resultados en términos de producir lípidos para una industria de biocombustibles sostenible. Diversos estudios concluyen que cuando las microalgas son estresadas ya sea por menos adición de nutrientes, oxígeno u otros aspectos tanto de origen físico y químico, o la combinación de ambos, aumenta de forma significativa el contenido de triglicéridos, seguido de grandes cambios en su contenido de lípidos y ácidos grasos. Los métodos químicos más utilizados en investigaciones son la reducción de nutrientes en su medio de cultivo (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), el contenido de sales en el medio de cultivo y el pH del agua; los aspectos físicos más utilizados son los cambios de temperatura y de luz solar o artificial. La adición de una menor cantidad de nitrógeno es el factor que más influye en el cambio de comportamiento en los lípidos (De et al., 1999; Li et al., 2008c; Hu et al., 2008; Mendoza et al., 2008; Solovchenko et al., 2008; Gouveia y Oliveira, 2009; Rodolfi et al., 2009).

La etapa en la que se encuentre el cultivo ya sea exponencial, estacionaria o declive de las microalgas afecta de forma significativa en el contenido lipídico, pudiendo observarse que en la etapa estacionaria hay la mayor cantidad de aceite (Spolaore et al., 2006; Hu et al., 2008). Bigogno et al., (2002) reportó que en *Parietochloris incisa* posee una buena composición triacilglicerol conforman el 43% del total de ácidos grasos en la etapa exponencial.

Una disminución de nutrientes sobre la síntesis de lípidos fue estudiada por primera vez en algas verdes (Shifrin y Chisholm, 1980), en años más recientes se han estudiado las cianobacterias. Olguín et al., (2001), concluyeron que los lípidos que componen la *Spirulina sp.* (*Arthrospira*) incrementaron tres veces del peso seco, al adicionar menos nutrientes especialmente nitrógeno, además, se mantuvieron siempre con una baja cantidad de luz ($66 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El género *Dunaliella*, se ha concluido que la mayor cantidad de lípidos en su composición son triglicéridos y que limitándolas de nutrientes, su composición de lípidos aumenta hasta 22 veces (Gordillo et al., 1998). *Neochloris oleoabundans* puede acumular una enorme reserva de triglicéridos siendo sus ácidos grasos en su mayoría saturados (Tornabene et al., 1983), siendo esta especie una de las más atractivas para un

cultivo industrial para obtener biocombustibles. Se descubrió que *Nannochloropsis* sp. adicionándole una pequeña cantidad de dióxido de carbono favoreció la aparición de EPA muy importante en la industria farmacéutica (Hoshida et al., 2005).

El grupo israelí Cohenen uno de sus estudios observaron que *P. incisa*, tiene reserva del ácido eicosatetraenoico y un noventa por ciento de la composición de este ácido se encuentra en forma de TAGs. Si se cultiva bajo un estrés por disminución de nutrientes la composición de ácidosgrasos conforma la tercera parte de su la biomasa deshidratada obtenida y el ácido eicosatetraenoicosuperó el sesenta por ciento de los ácidos grasos (Khozin-Goldberg et al., 2002). En los últimos años se encontró que una adición elevada de luz en el cultivo de alcanzan un gran cantidad de ácidos grasos y si las sometemos además a una disminución de nutrientes el contenido de ácido eicosatetraenoicoiguala el porcentaje de ácidos grasos (Solovchenko et al., 2008).

Según Greenwell et al., (2010) *Neochloris oleoabundans* de origen continental y *Nannochloris* sp.de origen marinatuvieron una composición de lípidos de casi el 30% siendo idóneas para biodiesel. En la actualidadinvestigadoresestán obteniendo microalgas modificadas gracias a la genética, siendo este un campo que está en los inicios (Radakovits et al., 2010). Lo que es un hecho es que se verán mejores resultados en un futuro no muy lejano, ya que falta un mayor conocimiento en poder modificar los lípidos en las microalgas.

Abdel-Raouf et al. (2012), las microalgas además de ser altamente eficientes en el tratamiento de aguas residuales, son microorganismos que tienen un alto contenido de lípidos que se pueden aprovechar como fuente de biocombustible, ya que los métodos actuales de cultivo de microalgas para producción de biocombustibles resultan costosos, por lo que una alternativa económica y ambientalmente viable sería aprovechar los efluentes de WSP y HRAP, que contienen altas concentraciones de biomasa algal.

Panorama a nivel Regional del Cultivo de Microalgas

América Latina tiene ventajas en el cultivo de microalgas para la obtención de aceite, entre ellas, el suelo, el clima, la disponibilidad de tierras y los costos de mano de obra más bajos. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, la región a excepción de Brasil, no ha tomado suficientes medidas para explorar este potencial. Existen varios programas para la producción de biodiesel a partir de aceite de microalgas en América Latina. Uno de ellos es llevado a cabo por Brasil, el cual es uno de los países líderes en el desarrollo de productos a partir de microalgas, especialmente en la rama de biocombustibles estos programas se basaron en la producción de biodiesel a base de *Glycine max*(soja). En Argentina se está produciendo biodiesel a partir de *Glycine max*(soja). El problema es que para producir este tipo de biodiesel se llevan a cabo monocultivos, los que tienen consecuencias tales como, erosión, pérdida de materia orgánica, balance negativo de nutrientes, desertificación y reducción de la biodiversidad. Algunos expertos argentinos, opinan que la producción de biodiesel a partir de maíz puede no tener un buen rendimiento y por otro lado se necesita un alto costo energético para la producción de biodiesel a partir de maíz. Según el presidente del INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial de Argentina) puede alterar los precios del maíz y la soja, lo que los haría menos accesibles a los consumidores. Por esta razón existen empresas latinoamericanas que están experimentando con la producción de biodiesel a partir de algas.

En el Brasil la industria de los biocombustibles es la más desarrollada, no sólo por niveles de producción, sino también por sus proyectos de investigación y desarrollo, planificación y leyes de fomento promulgadas por el gobierno.

Luego de lograr una industria sólida del etanol³⁶, el Gobierno Brasileiro ha optado por impulsar la formación de clusters complementarios; se produce biodiesel en zonas donde también se produce etanol. Los sembríos, las plantas de producción de etanol, las plantas de extracción de aceite y las plantas de producción de biodiesel, se encuentran relativamente cerca y abastecen a las ciudades aledañas.

La geografía brasileña le permite hacer planes masivos y es un país que soporta niveles de productividad relativamente bajos, pero que a pesar de ello genera proyectos rentables. Existen instituciones grandes que han venido estudiando las oleaginosas como es el caso de la *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA)* que ha estudiado *Ricinus*

communis (higuerilla) por más de 20 años, llegando al punto de poseer tecnología madura para ser aplicada a la higuerilla, que permite altos niveles de rentabilidad para los agricultores.

Desde el punto de vista de tecnología, la empresa brasilera PETROBRAS está investigando y desarrollando tecnología propia para la producción de biocombustibles, incluso acaba de patentar dos procesos de transesterificación. A partir de la estructura de refinamiento del crudo hacen una transesterificación más económica del aceite haciendo que cualquier refinería pueda producir biodiesel a menor costo, y el otro es que han desarrollado la transesterificación *in situ*, la cual consiste en hacer la transesterificación dentro de la semilla triturada extrayendo casi el 100% de biodiesel, aumentando el rendimiento, reduciendo las pérdidas y descartando procesos de refinamiento, desodorización, blanqueado, etc.

Producción de biodiesel a nivel nacional

El principal cultivo en el Perú para la producción de biodiesel es *Elaeis guineensis* (palma aceitera), según Bruinsma (2009), en el 2009 el Perú tenía un área total de cultivo de palma aceitera de 42 657 hectáreas (Has), siendo los departamentos de Ucayali y San Martín los que abarcaron la mayor parte de dicha área con un 82% del total de áreas sembradas entre ambos departamentos distribuidos en un 60% por siembra a pequeña escala, mediante familias campesinas con menos de 20 hectáreas, y un 40% por siembra a gran escala.

Según los datos del Anuario de Producción Agrícola del Minagri, la superficie cosechada de palma aceitera (un aproximado del área sembrada) ha crecido. En 2010, la cosecha abarcó 19 mil Has mientras que en 2015 fue de 43.1 mil Has.

Bruinsma (2009) expuso que la producción a gran escala de palma aceitera se realizaba principalmente a través de 5 grandes empresas, entre las cuales se encontraba la empresa privada “Palmas del Espino”. Esta empresa posee la planta más grande a nivel nacional, ubicado en Tocache y perteneciente al grupo Romero. Esta se dedica al proceso de extracción de aceite crudo, refinado y elaboración de biodiesel. En segundo lugar, la planta extractora de aceite “Oleaginosas Amazónicas” (OLAMSA) establecida con apoyo financiero de las Naciones Unidas. Además, están las plantas de “Oleaginosas Padre Abad” (OLPASA) en Campo Verde (Ucayali), “Oleaginosas del Perú” (OLPESA) en Tocache (San Martín) e

“Industria de Palma Aceitera de Loreto y San Martín” (INDUPALSA), las cuales se crearon en base a un proyecto de DEVIDA y las Naciones Unidas; por último, está la planta de extracción de aceite INDUPALSA en Caynarachi.

Iniciativas relacionadas con el biodiesel en el Perú

Se realizó una investigación llamada Opciones para la producción de biodiesel a pequeña escala en el Perú, en el año 2004 por:

PhD. José Luis Calle Maraví, UNALM (Universidad Nacional Agraria la Molina).

Javier Coello Guevara, ITDG.

Paula Castro Pareja, UNALM.

Mirtha Nazario Ramírez, UNALM.

Fernando Acosta Bedoya, UAP (Universidad Alas Peruanas).

Este estudio consto de dos casos:

a) Materia prima: Insumos oleaginosos de la Amazonia peruana (CONCYTEC-2004).

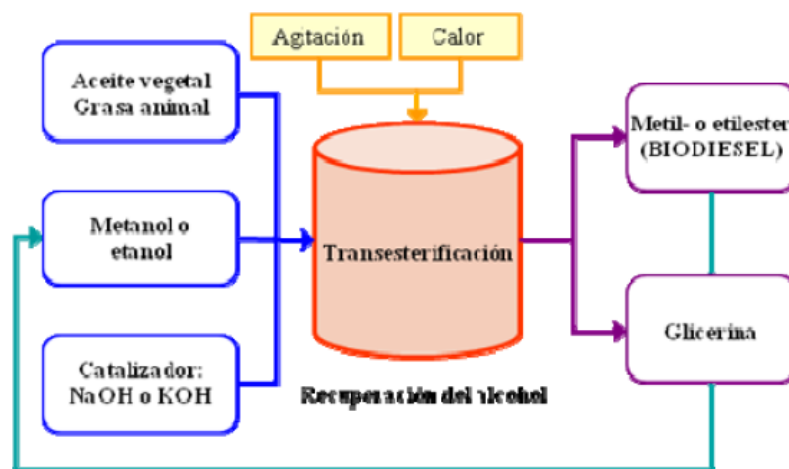


Figura 1: Proceso de obtención de biodiesel (ITDG-CONCYTEC. (2004). “Producción de Biodiesel a pequeña escala a partir de Recursos Oleaginosos Amazónicos”. *ITDG-CONCYTEC*, volumen 1:25 diapositivas)

b) Materia prima: Aceites vegetales de desecho generados por el comedor universitario de la UNALM:

La generación de aceites usados en el comedor universitario fue de aproximadamente 50 litros semanales; el aceite producido cumplía con los estándares internacionales de calidad, además, el rendimiento de biodiesel obtenido fue de 89.6% en relación al aceite utilizado.

Proyecto de biodiesel en San Martín

Hace exactamente 13 años se ejecutó un emprendimiento para elaborar biocombustibles a base de plantas vegetales con un alto contenido de lípidos desarrollado por la Agencia de Desarrollo y Recursos Asistenciales en la Amazonia peruana. El emprendimiento consistía en obtener siete mil galones por semana de biocombustibles en la provincia de Picota. Lamentablemente con el pasar de los años ya no se tuvo información sobre este novedoso proyecto.

Libro Combustibles alternativos para el desarrollo de la industria regional

La Universidad de Lima, a través de su Fondo Editorial, publicó la investigación Combustibles alternativos para el desarrollo de la industria regional, la cual comprendía «el estudio comparativo de los combustibles alternativos, la materia prima para fabricarlos, la tecnología de los procesos productivos y algunos aspectos de costos de inversión y operación en relación con el desarrollo industrial regional del Perú». Los combustibles analizados fueron: biodiesel, bioetanol, dimetil éter (DME y Biodme), gas natural y propano.

Capítulo II: Marco Teórico

2.1 Historia del biodiesel

La transesterificación de los aceites vegetales fue desarrollada en 1853 por el científico Patrick Duffy, muchos años antes de que el primer motor diésel funcionase. El primer modelo de Rudolf Diesel, un monocilíndrico de hierro de 3 metros con un volante en la base funcionó por vez primera en Augusta (Alemania), el 10 de agosto de 1893. Diesel presentó su motor en la Exposición Mundial de París de 1900. Este motor es un ejemplo de la visión de Diesel, ya que era alimentado por aceite de maní, un biocombustible, aunque no estrictamente biodiesel, puesto que no era transesterificado. Diesel quería que el uso de un combustible obtenido de la biomasa fuese el verdadero futuro de su motor. En un discurso de 1912, dijo el uso de aceites vegetales para el combustible de los motores puede parecer insignificante hoy, pero tales aceites pueden convertirse, con el paso del tiempo, importantes en cuanto a sustitutos del petróleo y el carbón de nuestros días.

2.2 Métodos alternativos sustentables o sostenibles energéticos

Uno de los grandes impactos que ha tenido el ser humano en el mundo son las diversas consecuencias del uso de recursos naturales para asegurar un abasto de energía apropiado para así sostener el desarrollo económico, tecnológico, y los patrones de consumo de las grandes potencias en los últimos siglos (Perez, 2008). puesto que las fuentes fósiles de energías son limitadas, convirtiéndose en insostenibles por la disminución en todo el mundo, y agravado por el impacto ambiental de las emisiones de CO₂ y las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Sandoval, 2010), es inevitable sustituirlas por fuentes renovables de energía (Hackenberg, 2008) y amigables con el ambiente (Ramluckan, Moodley, & Bux, 2014).

2.3 Fuente de Energías Renovables Sostenibles

A manera de introducción se iniciará con la explicación de las energías renovables, ya que el biodiesel es un combustible que se obtiene a partir de una energía renovable: la biomasa.

Las energías renovables son aquellas que se pueden regenerarse constantemente con ayuda de la inventiva del hombre, la más utilizada es la energía solar.

El sol es la fuente primaria de energía que da origen a todas las demás fuentes renovables, entre las que se tienen:

Energía solar directa: los rayos del sol puede usarse para producir energía calorífica.

Energía eólica: los rayos solares aumentan la temperatura del aire que se encuentra en el medio ambiente, la diferencia de presiones generan las corrientes eólicas. La materia prima utilizada para la generación de esta fuente es el viento, muy útil para la generación de energía calorífica o para trabajos mecánicos en la industria moderna..

Energía hidráulica: aprovecha la caída del agua (energía cinética) a una determinada altura para generar energía hidráulica.

La energía de la biomasa: se produce gracias a l flora y faunacomo árboles, derivados de alcohol, humus, entre otros,se puede obtener, además,de la fotosíntesis de las plantas.

2.4 Biocombustibles

2.4.1 Generalidades:

En el último siglo la proliferación de dióxido de carbono en el medio ambiente junto con el agotamiento de los yacimientos petroleros, ha despertado el interés de los países por producir alternativas de energías para poder subsistir. La alternativa que tiene un gran impacto a nivel mundial en las últimas décadas es el biodiesel (Halim et al., 2012).

Las energías renovables son aquellas que se generan a través de diversas energías que el hombre ha estado utilizando en el último ciclo como la energía hidráulica, energía solar, energía eólica y la energía a través de seres vivos como las microalgas. Si nos enfocamos en la energía a partir de seres vivos tenemos principalmente las microalgas, seguida de plantas oleaginosas (Dufey, 2006; Koizumi, 2014). La microalgas son la principal fuente para generar biodiesel en un futuro cercano (Fernández, Montiel, Milán, & Badillo, 2012), debido a que producen gran cantidad de lípidos ricos esenciales, capturan el dióxido de carbono de forma eficiente y necesitan menos hectáreas para producir biodiesel que los cultivos convencionales (Glembin, Cerner, & Smimova, 2013).

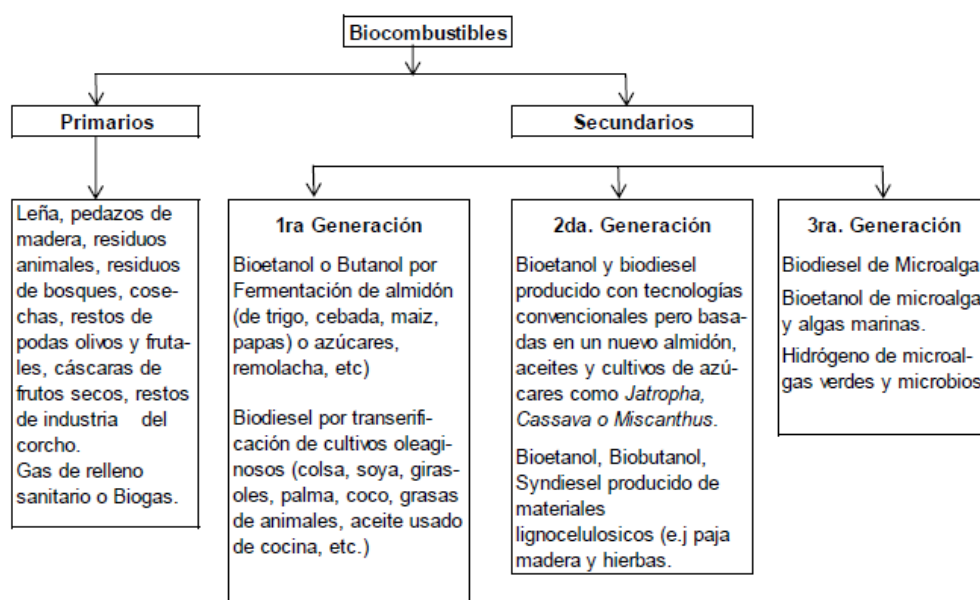
2.4.2 Clasificación de Biocombustibles

Los biocombustibles hacen referencia a los combustibles sólidos, líquidos o gaseosos derivados de materia orgánica. Por lo general, se dividen en biocombustibles primarios y secundarios (Figura 1) (Dragone, Fernandes, Vicente, & Texeira, 2010).

Los biocombustibles primarios constituidos por materias lignocelulosas procedentes del sector agrícola o forestal y de las industrias de transformación que producen residuos de dicha naturaleza como la leña (Mosquera Martínez & Merino Ruesga, 2006), se utilizan en forma no procesada principalmente para la calefacción, la cocina o la producción de electricidad. Los biocombustibles secundarios, siendo los principales el bioetanol y el biodiesel (Mosquera Martínez & Merino Ruesga, 2006) son producidos por el procesamiento de biomasa y son capaces de ser utilizados en diversos procesos industriales y en vehículos (Dragone et al., 2010), y representan cerca del 90% del biocombustible usado a nivel global (Dufrey, 2006).

Los biocombustibles secundarios se pueden clasificar en tres generaciones: biocombustibles de primera, segunda y tercera generación sobre la base de diferentes parámetros, tales como el tipo de tecnología de procesamiento, el tipo de materia prima o su nivel de desarrollo (Dragone et al., 2010).

Tabla 2: Clasificación de Biocombustibles (Dragone et al., 2010).



Fuente: Dragone et al., 2010.

La digestión de la biomasa en condiciones anaerobias da origen al llamado biogás o biometano, producto de alto valor calórico. Este tipo de transformación se produce de manera espontánea en pantanos o fondos de lagunas y lagos en los que hay depósitos de materia orgánica. También se produce en los vertederos de residuos sólidos urbanos (RSU), donde se puede recuperar el gas mediante perforaciones (Mosquera Martínez & Merino Ruesga, 2006). El biogás se compone principalmente de una mezcla de metano (55-75%) y CO₂ (25-45%). Este puede ser usado como gas combustible y también ser convertido para generar electricidad (Korres, O’Kiely, Benzie, & West, 2013).

El bioetanol es un combustible líquido similar a la gasolina que se obtiene como producto de la fermentación de materias vegetales ricas en azúcares o almidón o de biomasa lignocelulosa (Diez Bellido, 2013). En general, dos métodos son adoptados normalmente para la producción de bioetanol a partir de biomasa. El primero es un proceso bioquímico, es decir, la fermentación y la otra es por termo-química o gasificación. Un número de ventajas se han reportado en la producción de bioetanol a partir de algas. El proceso de fermentación implica

menos consumo de energía y es mucho más simple en comparación con el sistema de producción de biodiesel. Adicionalmente, el dióxido de carbono producido como un subproducto de la fermentación es utilizado como nutrientes en la producción de biomasa algal, colaborando con un medio ambiente más limpio y retardando así el efecto del calentamiento global. Sin embargo, la tecnología para la producción comercial de bioetanol a partir de microalgas está todavía en desarrollo y se sigue investigando (Gendy & El-Temtamy, 2013).

2.4.3 Biodiesel

Los biocombustibles están compuestos de cadenas cortas siendo el más representativo el radical etano y metano, siendo sus cadenas más largas los ácidos grasos obtenidos de los aceites vegetales, aceites utilizados para frituras (Zhang, 2003), los lípidos obtenidos de los animales y de la biomasa algal (Fernández et al., 2012). Es la fuente de energía renovable más utilizada por el hombre que no contamina el medio ambiente y no causa daños a los seres vivos (Gendy & El-Temtamy, 2013).

Los métodos convencionales para la obtención de estas fuentes son: las emulsiones industriales, pirolisis, y transesterificación, esta última es el método más sencillo para obtener biocombustibles. La transesterificación es la reacción entre triglicéridos y un alcohol alifático de cadena corta especialmente el metanol para producir alquil-ésteres de ácidos grasos (biodiesel) y glicerol como subproducto, previo tratamiento con hidróxido de sodio (figura 2). Con una cantidad suficiente de aceite es factible su transformación en biocombustible (Aldo de la Cruz Benitez¹, Benito Reyes Trejo¹, Diana Guerra Ramírez, & Ramírez¹, 2013; Fernández et al., 2012; Martínez-Alcalá).

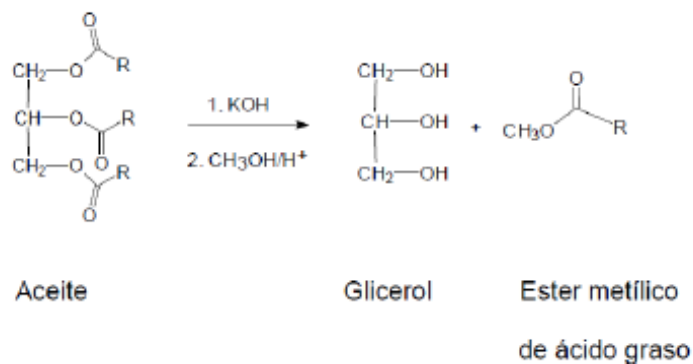


Figura 2: Reacción de Transerificación de aceite para obtener biodiesel Martínez-Alcalá (2015).

2.4.4 Potencial de los biocombustibles

El biodiesel al poder renovarse constantemente de forma rápida tiene una gran ventaja para poder cubrir los gastos de energía consumidas por el hombre. Las reservas fósiles al ser limitadas y no poder regenerarse no pueden competir con los biocombustibles. Otra ventaja competitiva es que al ser utilizadas contribuye a tener un buen control de ellas al ser sostenibles. Reduciendo el consumo de energías fósiles como el gas natural, contribuyendo a un menor gasto en importaciones de estas energías no renovables. Se tiene la esperanza que el uso en una gran cantidad en vez de energías no renovables contribuya a mejorar el medio ambiente y evitar así el calentamiento global. Por último el biodiesel puede traer desarrollo a zonas alejadas a las ciudades; generando puestos de trabajos nuevos y sacando a mucha gente de la pobreza. Todas estas razones son motivos suficientes para seguir impulsando el uso de estas fuentes renovables en todo el mundo (Koizumi, 2014).

Aunque los procesos de biocombustibles tienen un gran potencial para proporcionar una ruta de carbono neutral para la producción de combustible, los sistemas de producción de primera generación tienen considerables limitaciones económicas y ambientales. La preocupación más común relacionada es que a medida que las capacidades de producción aumentan, también lo hace su competencia con la agricultura por las tierras de cultivo dedicadas a la producción de alimentos. El aumento de la presión sobre la tierra cultivable utilizada

actualmente para la producción de alimentos puede conducir a la grave escasez de alimentos. Además, el uso intensivo de la tierra con las aplicaciones altas de fertilizantes y plaguicidas y el uso del agua pueden causar importantes problemas ambientales. La llegada de los biocombustibles de segunda generación está diseñada para producir combustibles a partir de biomasa lignocelulosa, la parte leñosa de plantas que no compiten con la producción de alimentos. Las fuentes incluyen los residuos agrícolas, residuos de cosecha forestal o de desechos de madera, tales como hojas, paja o virutas de madera, así como los componentes no comestibles de maíz o caña de azúcar. Sin embargo, la conversión de la biomasa de madera en azúcares fermentables requiere costosas tecnologías que implican un tratamiento previo con enzimas especiales, lo que significa que los biocombustibles de segunda generación aún no se pueden producir económicamente a gran escala. Por lo tanto, los biocombustibles de tercera generación derivados de microalgas se consideran como una energía alternativa viable que está desprovista de los principales inconvenientes asociados con la primera y segunda generación de biocombustibles. Las microalgas son capaces de producir 15 a 300 veces más aceite para la producción de biodiesel de los cultivos tradicionales en función de la superficie. Para que no quede duda que las microalgas son más eficientes que los cultivos de plantas oleaginosas debido a que producen biodiesel en un periodo muy corto de tiempo que varía de una a dos semanas, lo cual se pueden generar producciones continuas y en grandes cantidades durante todo el año (Dragone et al., 2010).

2.5 Microalgas como fuente de Biocombustibles

Las microalgas tienen un futuro prometedor por ser muy eficientes en la fotosíntesis, capturan una gran cantidad de dióxido de carbono y varios nutrientes a diferencia de las plantas, y cuentan con reservas que oscilan entre un veinte a ochenta por ciento de triglicéridos (Chisti, 2008).

La producción de biodiesel a partir de los lípidos extraídos de microalgas, han sido considerados como una prometedora y potencial fuente de combustible renovable que podría sustituir a los combustibles fósiles (Ramluckan et al., 2014). Sin embargo, este enfoque todavía no se comercializa debido a altos costos de los procesos que están asociados con el

tiempo y/o secado intensivo de energía, y los procesos de extracción de lípidos (Taher, Al-Zuhair, Al-Marzouqi, Haik, & Farid, 2014).

Cualquier proceso de producción de biocombustibles, que pueda sustituir con éxito un combustible convencional equivalente, debe cumplir tres requisitos básicos. En primer lugar, se debe producir suficiente materia prima para producir combustible a escala comercial, en segundo lugar, debe costar menos que los combustibles fósiles convencionales, y, por último, debe coincidir con las especificaciones estándar de calidad de los combustibles (Gendy & El Temtamy, 2013).

2.5.1 Generalidades de las microalgas

Las microalgas están divididas en procariotas y eucariotas, teniendo la gran ventaja de convertir los rayos de sol en energía química, se localizan en diversos ambientes, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (Amaya & Sarmiento, 2010). Como sabemos por bibliografía las microalgas no poseen tallos ni hojas el cual contienen un líquido verde denominado clorofila tipo “a” (Fernández et al., 2012; Hosikian, Lim, Halim, & Danquah, 2010).

2.5.2 Potencial de los combustibles a partir de Microalgas

El biodiesel producido a partir de la biomasa algal tiene varias ventajas como:

No afectan en la alimentación mundial como si las plantas oleaginosas que son la base de alimentación para muchos países sobre todo pobres (Ramluckan et al., 2014).

Pueden ser cultivadas en cualquier Tierra disponible, agua o solución salina, incluso en agua residual de manera que no afecta el uso del suelo para otros propósitos mientras que fuentes no comestibles de segunda generación, como la *Chlorella*, requieren grandes cantidades de

tierra cultivable (Bosnjaković, 2013; Ramluckan et al., 2014), y su cultivo no requiere el uso de herbicidas o pesticidas (Peñarranda, Martínez Roldan, & Villanueva, 2013).

Las microalgas utilizan el proceso fotosintético para generar una gran cantidad de aceites haciéndolo de forma tan eficiente por ser menos complejas que otras plantas, y sobre todo al ser cultivadas en medio acuático tienen una mayor disponibilidad de agua y nutrientes (Brennan & Owende, 2010; Dragone et al., 2010; Ramluckad et al., 2014).

Se reproducen de forma tan rápida y eficiente que se identificaron especies que pueden generar hasta cuatro veces su biomasa en un solo día (Hackenberg, 2008) existiendo especies de microalgas que contienen la mitad de su peso seco en lípidos para generar biodiesel (Bosnjaković, 2013).

La biomasa también se puede utilizar para la producción de alimento animal, etanol o metano. Los ácidos grasos libres que se forman a partir del hidrolisis de los triacilglicerol pueden ser utilizados en la cosmética e industria farmacéutica. El glicerol se puede utilizar para la síntesis de productos químicos o como una fuente de carbono para microorganismos.

El perfil de lípidos de las microalgas, se controlan a través de todos los factores físicos y químicos que afectan el cultivo, siendo el más importante la adición de nutrientes (Garibay, Vázquez-Duhalt, Sánchez, Serrano, & Martínez, 2009).

2.5.3 Producción de Biocombustibles de Microalgas

La biomasa de microalgas contiene tres componentes principales: proteínas, carbohidratos y lípidos (aceites) (Dragone et al., 2010). Los lípidos pueden ser definidos como cualquier molécula biológica que es soluble en un solvente orgánico. La mayoría de los lípidos contienen ácidos grasos y generalmente pueden clasificarse en dos categorías en base a su polaridad: (1) lípidos neutros que comprenden acilglicerol y ácidos grasos libres (FFA) y

(2) polares que pueden sub-clasificarse en fosfolípidos (PL) y glicolípidos (GL) (Halim et al., 2012).

La cosecha de microalgas está compuesta de diversas fases que se explican en la Figura 3 (Garibay et al., 2009). Las microalgas, el agua, nutrientes, la luz solar, se adicionan a los fotobiorreactores. El dióxido de carbono es esencial para los cultivos que se pueden extraer del medio que nos rodea, o también suelen adicionarse de tanques que son adquiridos por empresas especializadas que venden este producto como. A la hora de recoger la biomasa se debe quitar el agua y nutrientes remanentes son reutilizados de nuevo en el cultivo. Los lípidos obtenidos pasan por un proceso de transesterificación para obtener biodiesel y el glicerol que es un subproducto tiene varios usos comerciales (Garibay et al., 2009, Taher et al., 2014).

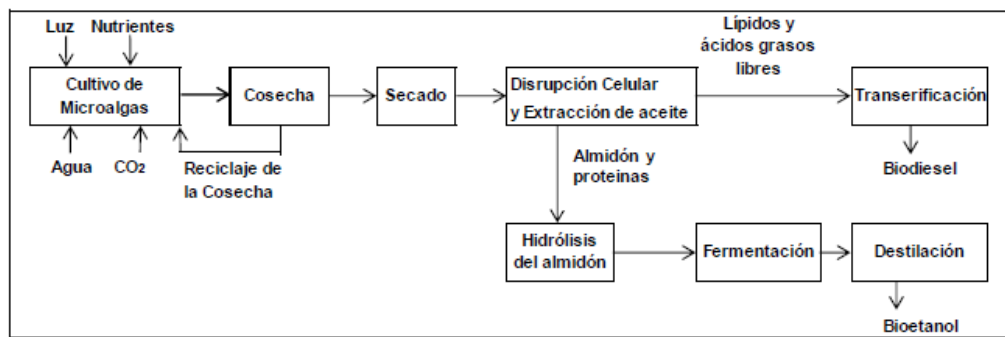


Figura 3: Proceso integrado de producción de biodiesel y bioetanol a partir de microalgas (Garibay et al., 2009).

La figura de arriba puede servir como esquema para aumentar la productividad de los productores de biodiesel, los residuos de biomasa seca y glicerol puede aprovecharse en diversas industrias como elaboración de jabones, para piensos acuícolas o utilizado como biocombustibles (Garibay et al., 2009).

A fin que el biodiesel de microalgas sea sostenible con el medio ambiente, el total de CO2 emitido en las etapas de procesamiento de aguas abajo debe ser inferior o al menos igual al total de CO2 capturado originalmente por las células de microalgas durante su cultivo. Por

lo tanto, los procesos seleccionados en cada paso deben apuntar a reducir al mínimo el consumo de energía (Halim et al., 2012).

2.6 Tecnologías para el cultivo de microalgas

Los cultivos intensivos de microalgas se suelen producir en estanques al aire libre o en fotobiorreactores en lugares no expuestos al medio ambiente (Figura 4A). Los fotobiorreactores siempre son utilizados en zonas cerradas (Figura 4B) (Garibay et al., 2009, Halim et al., 2012).



Figura 4: Técnicas para la producción de microalgas. (a) Sistemas con recirculación de agua. (b) Reactores en forma de tubos (Bosnjakovic, 2013).

El método donde las microalgas son expuestas al medio ambiente va a depender de las condiciones propias del lugar. El crecimiento aquí de las microalgas es irregular debido a que pueden proliferar otros organismos vivos que afecten el cultivo. Otro contexto son las microalgas cultivadas en sistemas no expuestos al medio ambiente ya que son más tecnificados y se puede tener un control exacto en cada fase del cultivo, pero se necesita una inversión fuerte de dinero para poder ejecutarse (Halim et al., 2012).

2.7 Tecnologías para la cosecha de microalgas

Para poder eliminar el contenido de humedad de las microalgas se utilizan diferentes procesos mecánicos como la sedimentación o centrifugación (Bosnjaković, 2013; Halim et al., 2012;

Taher et al., 2014 Son muy eficientes pero a veces representan la tercera parte del costo total para obtener el producto final (Taher et al., 2014).

A veces suele utilizarse floculantes como una etapa para obtener un producto más seco (Dragone et al., 2010). La floculación básicamente consiste en que la parte superior se encuentran sedimentos y en la parte inferior solo liquido removiéndose solo la superficie en el cual se concentra toda la biomasa algal (Halim et al., 2012). Hierro, sales de aluminio y polímeros son típicamente utilizados para flocular las células de microalgas sin afectar a la composición y la toxicidad del producto (Dragone et al., 2010). Los métodos de flotación están basados en la captura de las células de algas usando micro burbujas de aire dispersas, por lo tanto, al contrario de la floculación, no requiere adición de químicos. Algunas cepas flotan naturalmente hacia la superficie del agua mientras el contenido de lípido algal incrementa. Aunque la flotación ha sido mencionada como un método potencial de cosecha, existe una evidencia muy limitada de la viabilidad técnica o económica (Brennan & Owende, 2010). La centrifugación básicamente consiste en separar los sólidos de su centro de gravedad gracias a la fuerza centrífuga ayudado por la velocidad tangencial, es así que separa el líquido de la biomasa de interés comercial para producir biodiesel. Puede existir un riesgo al tener grandes velocidades la centrifugación puede destruir las células de las microalgas. Este método solo puede generar ganancias si son cultivadas de forma industrial (Bosnjaković, 2013).

La filtración es un método no muy utilizado ya que es costoso y si la biomasa algal es muy densa no traspasaría las membranas perdiendo mucho tiempo en este proceso (Bosnjaković, 2013).

Proceso de secado

Se requiere una etapa de secado antes de la extracción de lípidos de las células de las microalgas cosechadas. La energía proveniente del sol es lo más utilizado para reducir el contenido de humedad de las microalgas. El aspecto negativo es que toma demasiado tiempo lo cual resta eficiencia. Pero si usamos métodos industriales como secadores puede alterar el

perfil lipídico de las microalgas. Lo ideal en términos de ser más rentables sería no tener esta etapa o por último hacer una disminución del contenido de humedad a través del método húmedo (Taher et al., 2014), además, de ser más eficientes en la etapa de extracción de lípidos (González., Kafarov., & Monsalve., 2009).

Proceso de Pretratamiento

Los microorganismos algales poseen una pared celular externa semipermeable, resistente y rígida, que rodea la membrana protoplasmática y el citoplasma. Con el fin de extraer los lípidos del interior de la célula, es necesario romper la pared celular y la membrana protoplasmática. Los procesos de extracción están íntimamente relacionados con la disrupción celular ya que es utilizada para mejorar la liberación de los lípidos de las algas y mejorar el acceso del solvente en la extracción de los ácidos grasos (Galindo & González, 2010).

Entre los métodos que han sido usados para tal fin se encuentran métodos físicos y químicos, como ultrasonido, microondas, molino de bolas, autoclave, homogeneizadores de alta presión, enzimas, lisis ácida, lisis alcalina, y choque osmótico (Amaya & Sarmiento, 2010; Florentino de Souza Silva et al., 2014). El tipo de microorganismo, condiciones de cultivo, estructura, composición, y acondicionamiento previo de la célula afectan en la disrupción celular (Galindo & González, 2010).

Extracción de lípidos

Para obtener biocombustibles se debe extraer la parte lipídica de las microalgas, esto se logra destruyendo las paredes celulares de la microalga, la forma más común de lograrlo es a través de una extracción con solventes orgánicos como el hexano o metanol o extrayéndolo con fluidos supercríticos (Sathish, 2012). Las metodologías más reconocidas a nivel mundial son el Folch, Bligh & Dier, o Soxhlet el cual es la metodología que se utilizara en esta tesis (Taher et al., 2014). Hay mucha bibliografía que habla sobre el método de extracción de lípidos para obtener biodiesel (González et al., 2009).

Transterificación de Lípidos

La transterificación da como productos el alquil-ésteres de ácidos grasos (biodiesel) y glicerol como subproducto, el cual ya fue tratado con hidróxido de sodio. Cuando el metanol se utiliza, la reacción produce el éster metílico de ácido graso o biodiesel (Halim et al., 2012).

En experimentos a escala de laboratorio, donde sólo pequeñas cantidades de lípidos de microalgas crudo están disponibles, una gran cantidad de metanol es a menudo añadido para asegurar transterificación cuantitativa. Una vez completada la transterificación, la mezcla de la reacción, que contiene el biodiesel, y los subproductos contaminantes (glicerol, catalizador alcalino, y el exceso de metanol); a continuación, se somete a la purificación post-transterificación para eliminar los subproductos. Los análisis de la composición FAME del biodiesel purificado de los lípidos se lleva a cabo utilizando un cromatógrafo de gases (Halim et al., 2012).

Métodos de extracción de aceites

Extracción de lípidos con solventes: técnicas de extracción con solventes son ampliamente usadas y eficaces para la extracción de lípidos a partir de microalgas. Esto es debido a la alta solubilidad de los lípidos en solventes no polares tales como cloroformo, hexano y éter de petróleo. Existen diferentes protocolos de extracción estándar tal como la extracción Folch, Bligh y Dyer, y el Soxhlet o técnicas de Gold-Fisch. Aunque el uso de solventes para extraer lípidos de algas es bastante sencillo, hay inconvenientes cuando se aplica a las microalgas. La extracción requiere que el agua se elimine de la biomasa antes de la extracción de lípidos para tener resultados óptimos. Si la biomasa no se seca hasta un cierto punto, el agua tiende a interferir en el proceso de extracción protegiendo los lípidos de la extracción con el solvente.

El método de Bligh y Dyer: ocurre cuando se mezcla la biomasa algal con solventes orgánicos los más comunes cloroformo y metanol. Luego se hace una separación mecánica a través de una centrifugación con el objetivo de separar las biomazas algal de la mezcla de

solventes orgánicas. Posteriormente se realiza un calentamiento para evaporar el solvente orgánico para que quede solo el lípido. Una gran desventaja de este proceso industrial es la contaminación que deja.

Método de extracción Soxhlet: proceso industrial que sirve para obtener lípidos provenientes de materia orgánica (Araujo et al., 2013). Este sistema se ha utilizado durante muchos años para obtener lípidos de microalgas. Consiste en colocar un solvente orgánico como etanol o hexano en el balón de ebullición; Una especie de tubo donde se pone la biomasa seca de la microalga del cual se va obtener lípidos. Posee, además, un condensador, luego de pasar por un proceso térmico ocurre la evaporación por el cual el solvente se condensa y cae a la cámara con forma de tubo, en el cual el hexano o etanol extrae el contenido lipídico de la biomasa seca algal hasta que el tubo queda lleno.

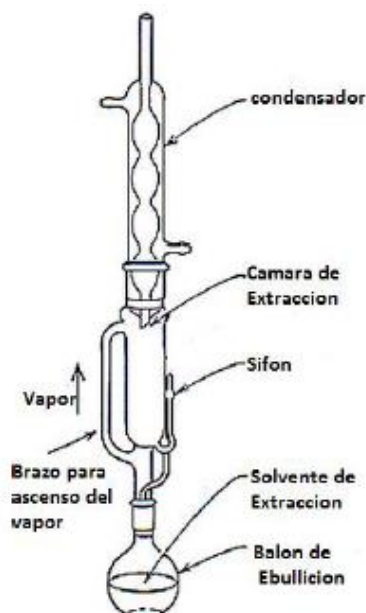


Figura 5: Equipo Soxhlet (El Autor)

El tubo lleno se sifonea hasta el balón de ebullición el cual posee el hexano o etanol, este proceso se repite varias veces (Figura 5).

El hexano es muy utilizado por tener grandes resultados en varios experimentados para obtener lípidos de las microalgas, además, es relativamente barato obtenerlo en términos de costos y es muy fácil recuperarlo para ser reutilizado (González et al., 2009). La extracción Soxhlet fue elegido por Ramluckan et al., debido a que es muy simple este proceso industrial a comparación de otros.

2.8 Factores de productividad y de producción de biocombustibles de microalgas

La variabilidad de lípidos en las microalgas es muy común entre los tipos de especies ya sean microalgas verdes, pardas o rojas, estas van de 5 a 77% (Tabla 2) (Brennan & Owende, 2010). Se puede aumentar el crecimiento de las microalgas a través de: (Brennan & Owende, 2010) la concentración de nitrógeno, la luz solar, (Weldy & Huesemann, 2007), gradiente de temperatura, salinidad del agua (Quin, 2005), dióxido de carbono presente en el cultivo (Morais & Costa, 2007), como se obtiene la biomasa seca (Chisti, 2008), el contenido de oxígeno en el cultivo (Halim et al., 2012).

Tabla 3: Contenido de aceites en algunas microalgas (Chisti, 2007).

Cultivo	Especie de microalga	Contenido lipídico (% peso seco)	Productividad lipídica (mg/l día)
	Botryococcus sp.	25,0 - 75,0	-
	Chlorella emersonii	25,0 - 63,0	10,3 - 50,0
	Chlorella vulgaris	5,0 - 58,0	11,2 - 40,0
Agua Dulce	Chlorella sp.	10,0 - 48,0	42,1
	Chlorococcum sp.	19,3	53,7
	Scenedesmus obliquus	11,0 - 55,0	-
	Scenedesmus quadricauda	1,9 - 18,4	35,1
	Scenedesmus sp.	19,6 - 21,1	40,8 - 53,9
	Dunaliella salina	6,0 - 25,0	116
	Dunaliella sp.	17,5 - 67,0	33,5
	Nannochloris sp.	20,0 - 56,0	60,9 - 76,5
Agua Marina	Nannochloropsis oculata	22,7 - 29,7	84,0 - 142,0
	Nannochloropsis sp.	12,0 - 53,0	60,9 - 76,5
	Neochloris oleoabundans	29,0 - 65,0	90,0 - 134,0
	Pavlova salina	30,9	49,4
	Spirulina platensis	4,0 - 16,6	-

Fuente: Chisti, 2007.

Con respecto a la Fase de Crecimiento, al comparar los lípidos obtenidos en la fase logarítmica y estacionaria, lípidos de la fase estacionaria, a pesar de tener una gran cantidad de lípidos polares (51-57%) en peso, contienen altos niveles de triglicéridos (20-41% del total de lípidos) siendo más atractivo para el procesamiento de biodiesel que los lípidos obtenidos en la fase logarítmica. Es decir, células de microalgas cosechadas durante la fase estacionaria tienen un contenido de lípidos polares más altos que el obtenido durante la fase logarítmica en una misma especie (Halim et al., 2012).

Mediante la privación de oxígeno algunas especies de microalgas han aumentado su contenido de lípidos de 10% a casi 20%. Células de microalgas generalmente responden a condiciones de escasos nutrientes mediante la intensificación de la vía metabólica que sintetiza lípidos neutros.

Lípidos Neutros (Acilglíceroles) son deseables para la producción de biodiesel a escala comercial por dos razones principales, debido a que, a escala industrial la transesterificación está diseñada para procesar acilglíceroles y estos generalmente tienen un menor grado de insaturación que otras fracciones de lípidos (lípidos polares) (Halim et al., 2012). Para una producción económica de biodiesel a partir de microalgas, la alta productividad de la biomasa y el contenido de lípidos son importantes. Estos dos factores son difíciles de lograr de forma simultánea, ya que la condición para favorecer una alta productividad de biomasa suele dar lugar a una baja acumulación de lípidos, y viceversa (Taher et al., 2014).

2.9 Reacción química del biodiesel

Se obtiene cuando el aceite vegetal, grasa animal o aceite de algas se mezcla con un alcohol, reaccionan y generan además de biodiesel, glicerina.

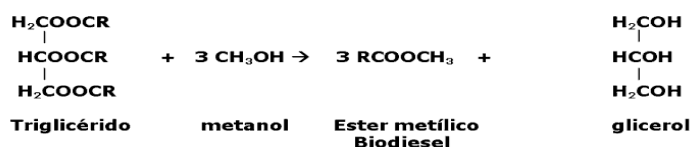


Figura 6: Reacción química del biodiesel (Cerdeira, S.; Ceretti, H. & Reciulschi, E.)

En este grafico se explica la reacción química del biodiesel, inicia cuando los triglicéridos se mezclan con 3 moléculas de metanol (o cualquier otro disolvente orgánico como hexano, etc.) mediante el proceso de catálisis da como resultado 3 moléculas de biodiesel (Ester metílico) con 3 moléculas de glicerina a este proceso se le conoce como transesterificación.

Esta molécula de Ester metílico (biodiesel) es muy similar a la molécula de petróleo ya que ambas son hidrocarburatadas la diferencia es que el Ester metílico contiene dos grupos funcionales de oxígeno.

2.9.1 Reacciones secundarias

En conjunto con la deseada reacción del biodiésel, hay muchas más reacciones que pueden ocurrir con varios contaminantes en el aceite. Los contaminantes en el aceite, ya sea agua o FFA, pueden producir efectos no deseados, siendo uno de éstos el jabón. NaOH y KOH reaccionan con el agua y los ácidos grasos libres para producir jabón. Dado que demasiado jabón en el biodiésel puede producir una emulsión, un paso importante en la producción del biodiésel es asegurarse de que la cantidad de agua es lo suficientemente baja como para evitar la producción de jabones.

2.10 Ley de biocombustibles en Perú

Fue aprobada por Decreto Supremo 013-2005-EM en el cual el artículo número uno de la ley número 28054 promueve la actividad de biocombustibles en nuestro país reduciendo los trámites administrativos, la libre competencia de biocombustibles, promover la industria agraria y ganadera, para generar una gran cantidad de empleos en nuestro país, disminuyendo el calentamiento global al utilizar menos combustibles fósiles, a continuación se explicará a groso modo esta ley:

En el título I

Disposiciones Generales

El artículo 1 dice, en todo momento se buscara facilitar y promover las inversiones y proyectos que fomenten la producción de biodiesel a nivel nacional, fomentando las facilidades económicas y el impacto que tendría en la disminución de los gases de efecto invernadero, además, se establecen los requisitos técnicos de seguridad para su producción y distribución; de modo que salvaguarde la salud pública y el medio ambiente y coadyuve a la Estrategia Nacional de Lucha contra las Drogas promoviendo la inversión en cultivos alternativos en las zonas cocaleras del país.

En el artículo 2, se explica que al mencionar el término “La Ley”, se está refiriendo a la Ley N° 28054- Ley de promoción del mercado de biocombustibles.

En el artículo 3, se dan diversas definiciones a términos relacionados a biocombustibles.

En el artículo 4, se refiere a la norma técnica peruana con la que se debe cumplir.

En el artículo 5, se menciona la aplicación a nivel nacional de la ley y que esta debe ser cumplida por los productores, comercializadores y distribuidores de biocombustibles.

Título II

De la promoción de los biocombustibles

Capítulo I

Porcentaje y cronograma de aplicación y uso del alcohol carburante y biodiesel: en el artículo 6 y 7 se dan los porcentajes de mezcla de gasolina con etanol y el cronograma de fechas en los que se entrará en vigencia dichas mezclas.

Los artículos 8 y 9 muestran los porcentajes de mezcla y cronograma de fechas respectivamente:

A partir del de enero del 2008 el Diesel N°1 y Diesel N°2 Ecológico (con 5% de biodiesel y 95% de diésel convencional) se comercializarán en las regiones de Loreto, Ucayali, Amazonas, San Martín y Huánuco.

A partir del 1 de enero del 2010 en todo el país.

En el artículo 10 señala que los productores nacionales de Alcohol Carburante y de Biodiesel deberán presentar al Ministerio de Energía y Minas, en el mes de enero de cada año, sus planes de producción quinquenal de etanol y biodiesel, detallando el volumen de producción mensual y el área geográfica en la cual se realizará.

El artículo 12 dice que todas las empresas grandes que comercializan combustibles fósiles son los únicos que pueden comprar biodiesel si es que se encuentran inscritos dentro de la base de datos del Ministerio de Minas.

En el artículo 13 se explica que las mezclas de etanol con gasolinas y de biodiesel con diésel se realizarán únicamente en las Plantas de Abastecimiento y las operaciones de mezcla estarán a cargo del Operador de la Planta de Abastecimiento.

Capítulo II

Promoción de cultivos para biocombustibles

Los artículos 14, 15, 16 y 17 hacen mención a los proyectos de cultivo para biodiesel y pueden ser revisados en el anexo Reglamento de la Ley N°28054- Ley de promoción del mercado de biocombustibles, Título 2, capítulo 2.

Capitulo III

Promoción para el desarrollo de tecnologías

En el artículo 18 se señala que se busca promocionar e incentivar la creación y el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción, comercialización y distribución de biocombustibles.

Capitulo IV

Programa de promoción del uso de biocombustibles

En el artículo 19 se menciona la creación del Programa del Uso de Biocombustibles (PROBIOCOM) y sus funciones.

Proinversión aprobó hace varios años todas las directrices para la comercialización de los biocombustibles en nuestro país (PROBIOCOM).

Esta directriz quiere facilitar los proyectos de inversión para promover y desarrollar la industria de biodiesel en el Perú como fuentes alternas de energías renovables.

Esto integra muchas instituciones diversas las cuales se dividen en varios grupos:

Grupo I

Promocionar la utilización de biocombustibles y los pagos que se deben hacer por derechos.

Grupo II

Todas las normas técnicas para una correcta homogenización.

Grupo III

Fomentar el mayor uso de biocombustibles a cargo de entidades de prestigio como OSINERGMIN.

Grupo IV y V

Fomento de los proyectos de inversión agrícola, además de la difusión de nuevas tecnologías e innovación en los procesos productivos.

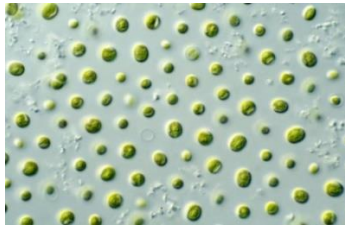
Capítulo III: Materiales y Métodos

La práctica se llevó a cabo en dos etapas, la primera en el laboratorio de Cultivos Menores de la facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villareal donde se llevó a cabo el crecimiento del cultivo, centrifugación y el secado de la microalga para obtener la biomasa seca, la segunda parte se llevó a cabo en el laboratorio de Contaminación Ambiental y Recursos Marinos de la misma facultad donde se realizó la extracción de lípidos de la biomasa seca de la microalga *Nannochloris* sp.

3.1 Familia de alga estudiada

Se idéntico el género *Nannochloris* sp., procedente del laboratorio de Cultivos Menores ubicada en la calle Roma 350 Miraflores, perteneciente a la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villareal.

Figura 7: Especie de microalga *Nannochloris* sp.



Fuente: Nuestro Acuario, 2018

Tabla 4: Una breve descripción sobre *Nannochloris* sp.

Clasificación:		
Empire:	Eukaryota	
Kingdom:	Plantae	
Subkingdom:	Viridiplantae	
Infrakingdom:	Chlorophyta infrakingdom	
Phylum:	Chlorophyta	
Subphylum:	Chlorophytina	
Clas:	Trebouxiophyceae	
Order:	Chlorellales	
Family:	Chlorellaceae	
Genus:	Nannochloris	

Fuente: Algaebase, 2018

Se logró cultivar con éxito esta especie que fue utilizada en el proceso de experimentación. Una parte esencial del proceso de experimentación consiste en la extracción de lípidos de la biomasa seca.

La extracción de lípidos se realizó principalmente con el ensayo Soxhlet: sin pasar mayor apuro o problemas de contaminación de la muestra.

3.2 Control de las condiciones que afectan el crecimiento en el cultivo de microalgas

Es fundamental saber todas las variantes que afectarían nuestro cultivo de microalgas con respecto a la generación de lípidos, como la adición de nutrientes, la luz solar, la gradiente de temperatura, el tiempo que lleva nuestro cultivo en los fotobioreactores, entre otros aspectos más. (Fernández et al., 2012).

3.3 Materiales utilizados para el control de las condiciones

Fotobioreactores

Botellas esterilizadas de plástico de 7 litros (Figura 8a).

Lámparas fluorescentes, con la finalidad de proporcionar al cultivo la fuente de energía lumínica necesaria para su crecimiento (Figura 8b).

Compresor de aire con difusor de aire que produce burbujas que servirán de oxigenación para las microalgas (Figura 8c).

Cinta de pH en empaque de 100 unidades (Figura 8d).

Termómetro de alcohol para controlar diariamente la temperatura del cultivo (Figura 8e).

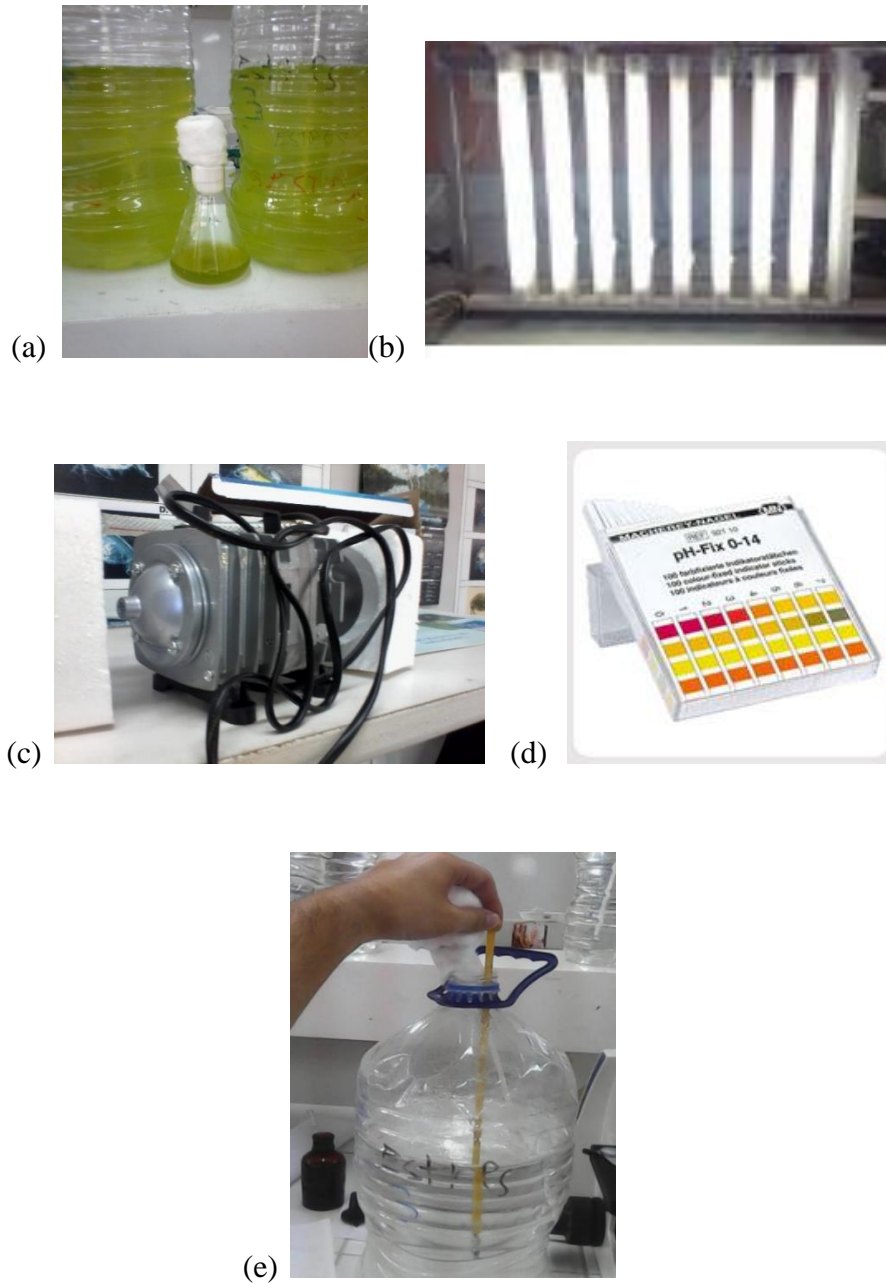


Figura 8: Materiales utilizados para el control de las condiciones. (a) Botellas de 7 litros. (b) Lámparas fluorescentes. (c) Compresor de aire. (d) Cintas de pH. (e) Termómetro (El Autor)

3.4 Medio de cultivo

El medio utilizado fue el Guillard F/2 y está comprendido por:

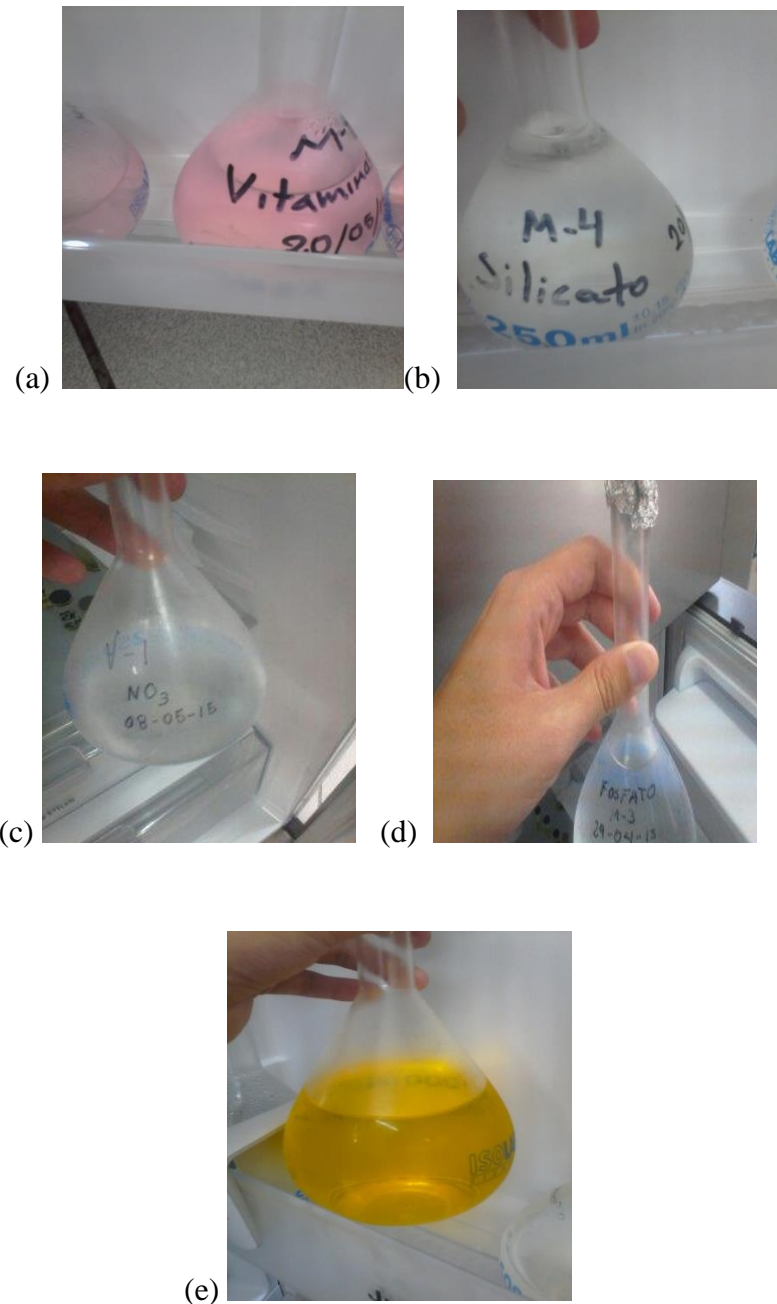


Figura 9: Componentes del medio de cultivo. (a) Vitaminas. (b) Silicatos. (c) Nitratos. (d) Fosfatos. (e) Traza de metales (El Autor)

3.5 Procedimiento para el cultivo de microalgas

Como primer paso se colocaron los nutrientes en los fotobioreactores con agua de mar ya esterilizada, se dejó circulando el agua de mar con el medio de cultivo en este caso Guillard F/2 por más de media hora para que haya una correcta distribución de todo el medio en cinco de los siete litros de la botella, para empezar después con el inóculo y el crecimiento del cultivo.

Como inóculo se colocó la especie *Nannochloris* sp. en cada fotobioreactor en este caso las botellas de 7 litros, se introdujo mediante una pipeta con una cantidad aproximadamente de 10 ml de microalga a excepción de las botellas N-4 y E-5 que se colocó un inóculo de 10ml en dos Erlenmeyer antes de ser colocados en las botellas, entiéndase que N es para las botellas con concentraciones normales y E botellas con limitaciones de concentraciones para causar estrés, en este caso la mitad de nutrientes.

3.6 Procedimiento para el control de las condiciones de cultivo

Luz: la energía lumínica que se proporcionó a la microalga *Nannochloris* sp. fue de forma continua durante toda la tarde y noche.

Oxígeno: se adicionará oxígeno al reactor, mediante una manguera y al final de esta, el difusor de aire.

3.7 Cosecha de la Biomasa

La biomasa algas se separó del medio de cultivo para su aprovechamiento. El tiempo óptimo para la cosecha fue cuando el crecimiento de las microalgas llegó al final de la fase exponencial, debido a que en este tiempo la calidad de los lípidos para biocombustibles obtenidos en la extracción es superior. Dicho crecimiento fue monitoreado diariamente tres veces al día a través del conteo en una cámara de Neubauer.

Se utilizó las técnicas de sedimentación, centrifugación, a continuación, se detallan los materiales y procedimientos que utilicé para cada técnica.

3.7.1 Sedimentación

Se recolectó para el cultivo en matraces de diferentes volúmenes según el requerimiento (Figura 10), aproximadamente el 80% retirando del sistema de agitación y aireación de los fotobioreactores. Posteriormente estos matraces fueron refrigerados, pero esta técnica no tuvo mucho éxito al ser la microalga muy pequeña por lo que se aplicó solo la centrifugación hasta obtener toda la biomasa seca.



Figura 10: Sedimentación. (a) Biomasa sedimentada (El Autor)

3.7.2 Centrifugación

La biomasa sedimentada en los matraces se colocó en tubos de plástico que se acomodaron en la centrifuga (Figura 11a), separando las fases sólidas y líquida por la diferencia de densidades, gracias a la fuerza centrífuga. La velocidad de rotación fue de 3500 rpm (Figura 11b).

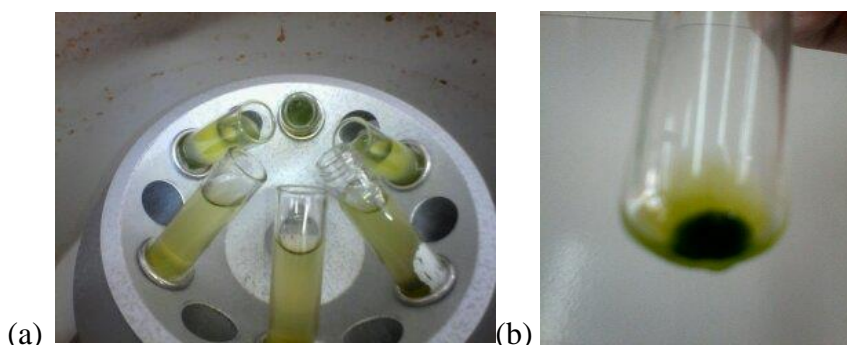


Figura 11: Centrifugación. (a) Tubos de plástico o vidrio de diferentes dimensiones.
(b). Separación de la microalga por centrifugación (El Autor)

3.8 Pretratamiento de la biomasa algal

Existen diferentes métodos de disrupción celular para efectivizar la extracción de lípidos. En esta tesis se utilizó el secado de la biomasa algal en el horno por ser un proceso de secado muy utilizado en referencias bibliográficas como Amaya & Sarmiento (2010) incluyeron a este proceso de secado como un pretratamiento.

3.9 Secado al horno y trituración de la biomasa algal

Se colocó las placas Petri con biomasa centrifugada en el horno a una temperatura entre 37°C a 40°C (Figura 12a) hasta que esta haya perdido todo el contenido de agua y se apreciara completamente sólido como una piedra para luego ser triturado con unas espátulas hasta que quede como un polvo con finas partículas (Figura 12b).

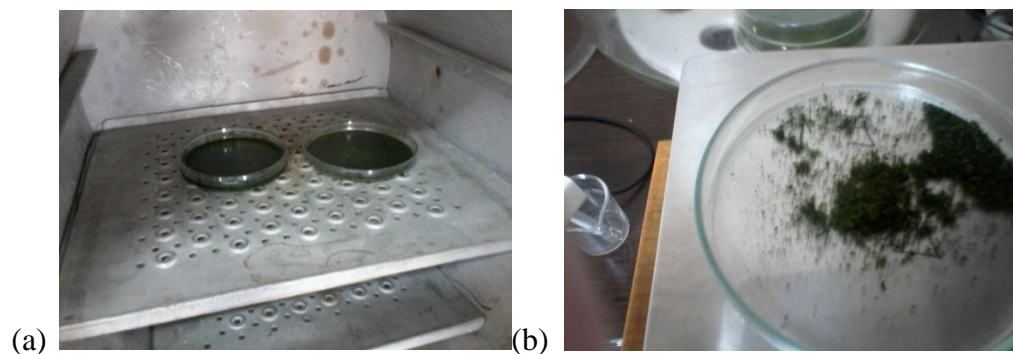


Figura 12: Pretratamiento de biomasa algal. (a) Biomasa algal colocada en el horno. (b) Biomasa sin contenido de agua (El Autor)

3.10 Metodología de extracción de lípidos y protocolos de experimentación con microalgas

Siendo el objetivo principal de esta tesis la obtención y ver el potencial de lípidos a partir de biomasa algal, se utilizó hexano como solvente para la extracción. Se realizó experimentos con biomasa sometida a condiciones de estrés provocado por la disminución de nutrientes a la mitad en el cultivo y cultivos con adición de nutrientes en concentraciones normales. Todas las extracciones se realizaron utilizando el método de extracción de Soxhlet.

3.11 Materiales y procedimientos de extracción con el método Soxhlet

Se utiliza para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica contenidos en un sólido a través de un solvente compatible. El equipo Soxhlet consta de un condensador, cámara de extracción, brazo para ascenso de vapor, sifón y balón de ebullición.

3.12 Proceso de extracción

Previo al proceso de extracción, se colocó el balón de ebullición vacío en la estufa a una temperatura de 105°C (Figura 13a). Luego se colocó el balón vacío en el desecador durante 11 minutos (Figura 13b), para finalmente obtener el peso constante del balón de ebullición vacío en la balanza de precisión.

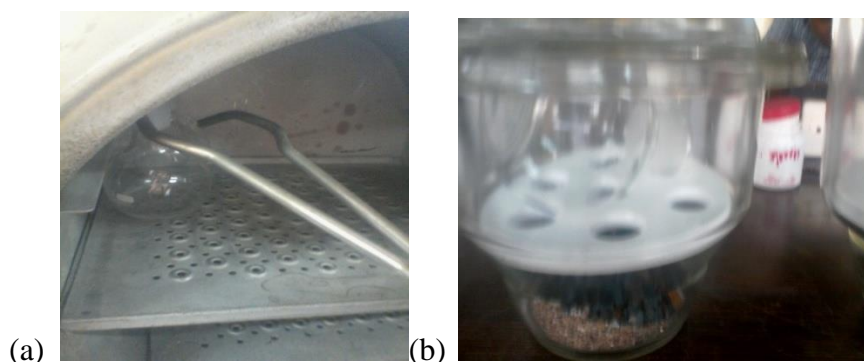


Figura 13: Preparación del balón de ebullición. (a) Balón de ebullición vacío en la estufa.

(b) Balón de ebullición vacío en el desecador (El Autor)

Seguido de esto se pesó y taró el cartucho de extracción, en donde se colocó la muestra seca de biomasa algal (Figura 14a). Luego de pesar el cartucho este fue colocado en la cámara de extracción de Soxhlet (Figura 14b).

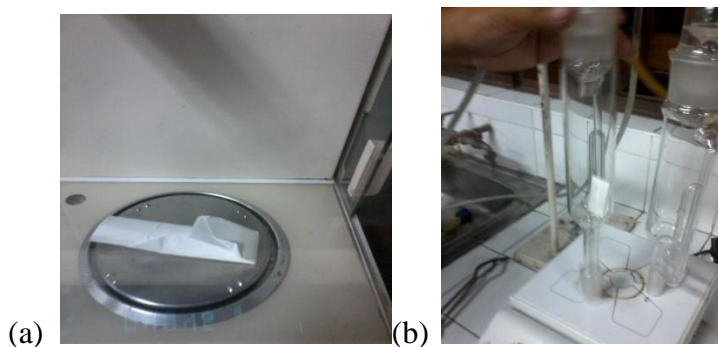


Figura 14: Preparación del cartucho para la extracción. (a) Peso del cartucho con biomasa

algal seca. (b) Colocación del cartucho en equipo Soxhlet (El Autor)

Después de ser colocado en la cámara de extracción del Soxhlet, se preparó el volumen del solvente para la extracción, se usó hexano. El solvente se colocó en la cámara de extracción teniendo en cuenta que su volumen sea capaz de alcanzar un sifonamiento en el extractor. Se utilizó mínimo 150 ml de solvente.

Para la preparación del solvente se procedió siguiendo un protocolo de seguridad apropiado ya que este compuesto químico es tóxico y se puede absorber por vía inhalatoria, oral y dérmica. Por lo que se usará un equipo de protección constituido por guantes para examen, mascarilla y gafas.



Figura 15: Preparación del solvente. Colocación del solvente en el equipo Soxhlet (El Autor)

Después se conectó al caño la entrada y salida del condensador del equipo Soxhlet. Esto permitió la recirculación de agua para el correcto funcionamiento de la condensación. Por la manguera ingresó el agua al equipo de condensación y por la otra manguera regresó al lavadero. La temperatura del agua dentro del baño termostático se controló para mantener frío el condensador (Figura 16).



Figura 16: Conexiones con la manguera al equipo Soxhlet para mantener frio el condensador (El Autor)

Finalmente se acopló la cámara de extracción, al balón de ebullición y el condensador de tal manera que el equipo quede ensamblado (Figura 17).



Figura 17: Equipo Soxhlet ensamblado ya con el balón de ebullición (El Autor)

3.13 Obtención de lípido algal

El lípido algal fue obtenido mediante la extracción sucesiva por la recirculación del solvente, debido a que el solvente se calienta y se evapora mientras los lípidos extraídos permanecen en el fondo del balón de ebullición (Figura 19a). Este ciclo se repitió hasta que no hubo más lípido que extraer en la cámara de extracción. Este punto se pudo apreciar en forma visual

cuando el solvente recuperó su color inicial (transparente) dentro de la cámara de extracción (Figura 19b). Una vez reutilizado el último sifonamiento se retiró el balón de ebullición junto con la cámara de extracción para retirar el cartucho y verter el solvente nuevamente dentro del balón de ebullición.

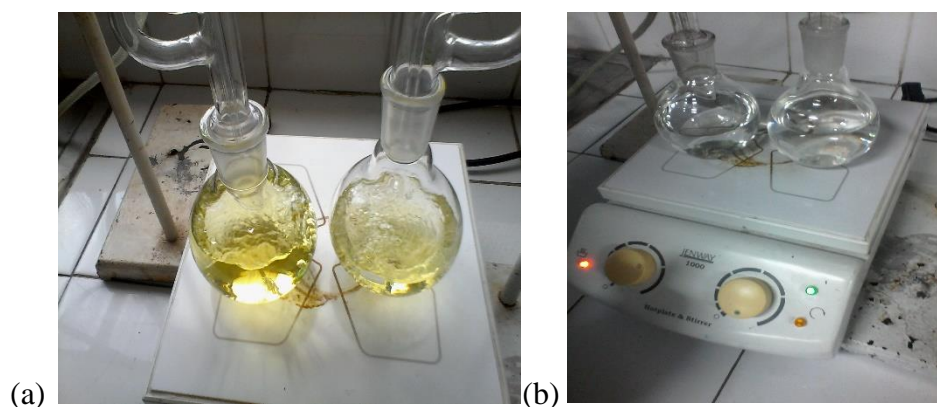


Figura 18: Obtención del lípido algal. (a) Lípidos extraídos mediante el solvente. (b) Balón de ebullición sin más lípido que extraer (El Autor)

3.14 Recuperación del solvente

Mediante la destilación se recuperó la mayor cantidad de solvente desde la cámara de extracción antes que se produzca un sifonamiento, procurando que el lípido obtenido dentro del balón de ebullición no se queme.

El solvente recuperado de las extracciones se almacenó en envases herméticos. Estos se guardaron en un lugar lejos de la luz para evitar reacciones químicas dentro de los envases evitando que su composición cambie (Figura 19).



Figura 19: Recuperación del solvente (El Autor)

3.15 Separación del solvente del lípido algal

Terminado el proceso de extracción de lípidos y recuperación de solvente, se secó el balón de ebullición en una estufa durante unos 5 minutos a una temperatura de 105°C para evaporar el solvente remanente (Figura 20a). Para obtener el peso seco del balón de ebullición con lípido algal, se colocó durante 11 minutos en el desecador y se procedió a pesar en la balanza analítica (Figura 20b).

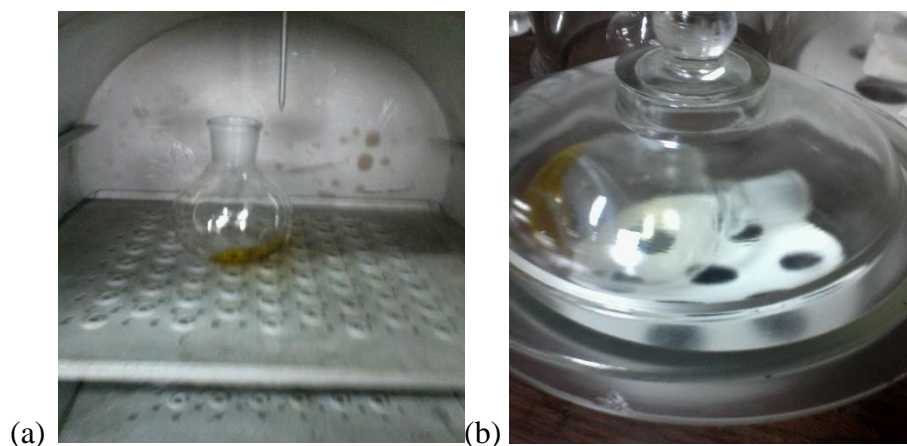


Figura 20: Separación del solvente del lípido algal. (a) Secado en el horno del balón de ebullición con lípido algal. (b) Desecación del balón de ebullición con lípido algal (El Autor)

3.16 Cuantificación del lípido algal

El solvente utilizado para la extracción de lípidos no tiende a discriminar los componentes presentes en las microalgas cuando se realizó la extracción. Esto implicó que la clorofila y productos asociados a una degradación formaron parte del extracto del lípido. Por tanto la cantidad de extracto a obtener de las extracciones que se realizaron en la tesis fue de lípido más clorofila, el cual se determinó mediante la ecuación 1.

$$\% \text{ de lípidos extraído + clorofila} = (P_I - P_v / \text{pesa de muestra algal}) / 100$$

Donde P_I : peso del balón de ebullición más lípido algal y clorofila.

Donde P_v : peso del balón de ebullición vacío.

Capitulo IV: Resultados

En la presente sección se muestra los resultados obtenidos en las dos etapas en la cual se llevó a cabo esta investigación, la primera etapa en el laboratorio de Cultivos Menores donde se controló diariamente el crecimiento del cultivo y el control de las condiciones ambientales (temperatura y pH) y la segunda etapa realizada en el laboratorio de Contaminación Ambiental y Recursos Marinos donde se analizó el rendimiento de biomasa seca de las dos concentraciones diferentes del cultivo (condiciones Normales y condiciones bajo Estrés) y el rendimiento de lípidos obtenidos de las dos concentraciones diferentes del cultivo, para poder determinar cuál es el más óptimo para la producción de biodiesel.

Se codificaron los fotobioreactores, para el cultivo a concentraciones normales se colocó la letra N-1 hasta N-4 y para las concentraciones bajo estrés se colocó E-1 hasta E-5.

Condiciones ambientales para el crecimiento del cultivo

Agitación: las condiciones de agitación o aireación que recibieron los fotobioreactores en toda la experimentación fueron constante durante las 24 horas los 28 días en el que se llevó a cabo el crecimiento del cultivo más dos semanas adicionales en las que se llevó a cabo la centrifugación. La aireación mostró gran eficiencia al evitar que las microalgas se peguen a las paredes de los fotobioreactores además de lograr una correcta homogenización de los nutrientes en cada uno de los fotobioreactores.

pH: se puede observar que en la Figura 22 el rango de pH estuvo entre 6 y 7, evidenciándose que el cultivo mayormente estuvo en un rango de pH 6 ligeramente ácido.

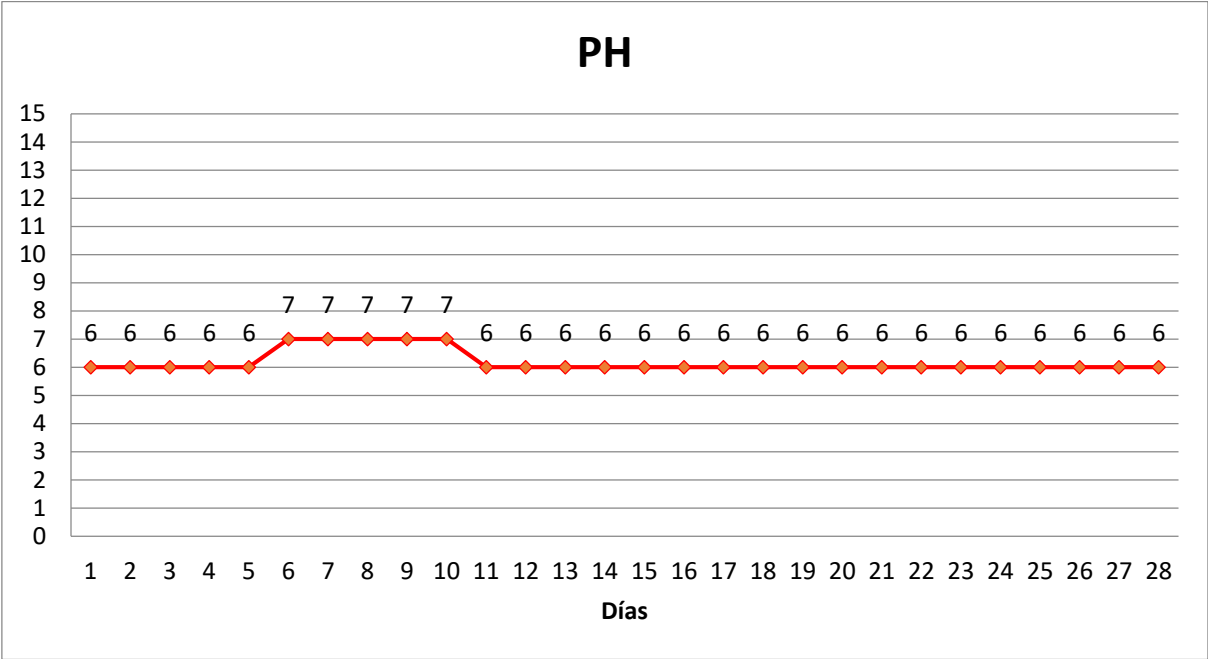


Figura 21: Curva del pH durante todo el cultivo de *Nannochloris* sp.

Temperatura: la temperatura fue más variable que el pH ya que influyó mucho la temperatura ambiental en los fotobioreactores, se llevó a cabo el cultivo durante los meses de diciembre a enero; durante el mes de diciembre la temperatura en las mañanas estuvo mayormente a 22°C, durante el medio día estuvo mayormente a 23°C y a las 4 de la tarde se colocó mayormente a 24°C como se observa en la Figura 23 ; en el mes de enero se observa algo distinto que las temperaturas tanto en la mañana y la tarde se elevaron ya que la temperatura ambiental aumento por ser verano, durante la mañana se observó mayormente un temperatura de 24°C, al medio día se observó una temperatura promedio de 24°C a 25°C y durante las 4 de la tarde se observó una temperatura promedio de 26°C.

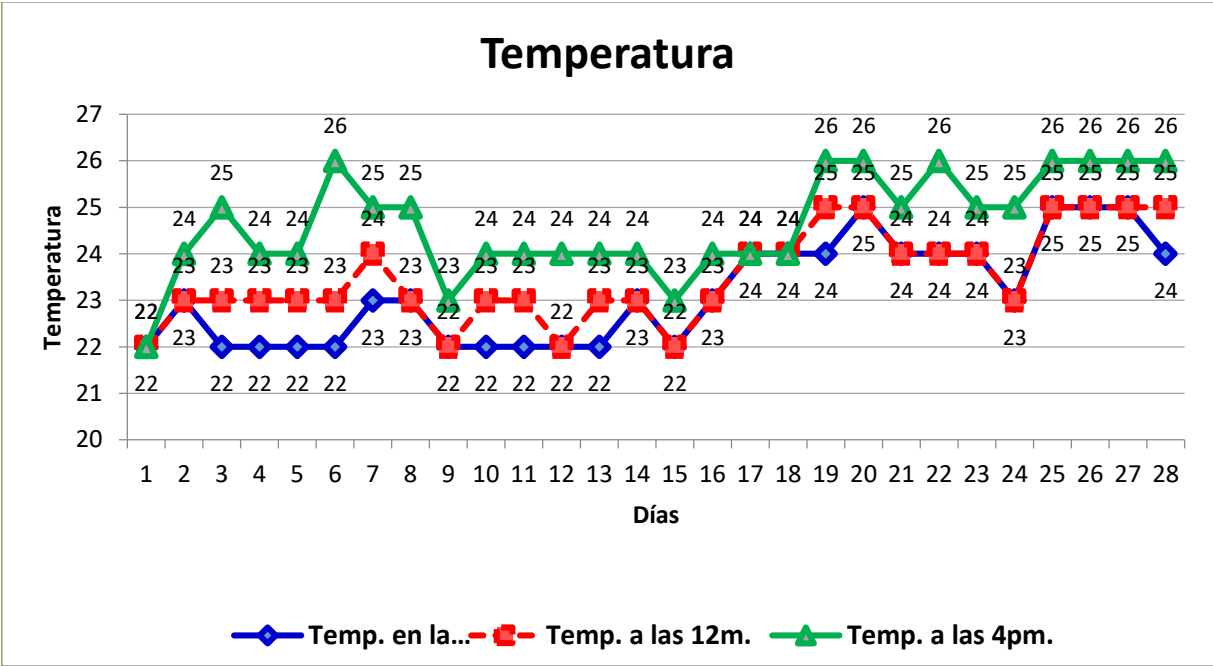


Figura 22: Curva de temperatura en la mañana, al mediodía y en la tarde durante todo el cultivo de *Nannochloris* sp.

Control del crecimiento del cultivo

Se monitoreo tres veces al día el crecimiento del cultivo en las dos diferentes concentraciones, el control del crecimiento se dio a las nueve de la mañana, al medio día y a las 4 de la tarde de lunes a domingo; la biomasa del cultivo se separó cuando el crecimiento de las microalgas se situó en la fase estacionaria. Cuando el valor del conteo en la cámara de Neubauer empezó a decrecer, este es un claro indicador de que las células de las microalgas estaban iniciando la fase de declinación o muerte por lo que se debía realizar la cosecha inmediatamente. El grafico 23 nos indica el crecimiento del cultivo en las dos concentraciones diferentes durante todo su crecimiento que duro 28 días.

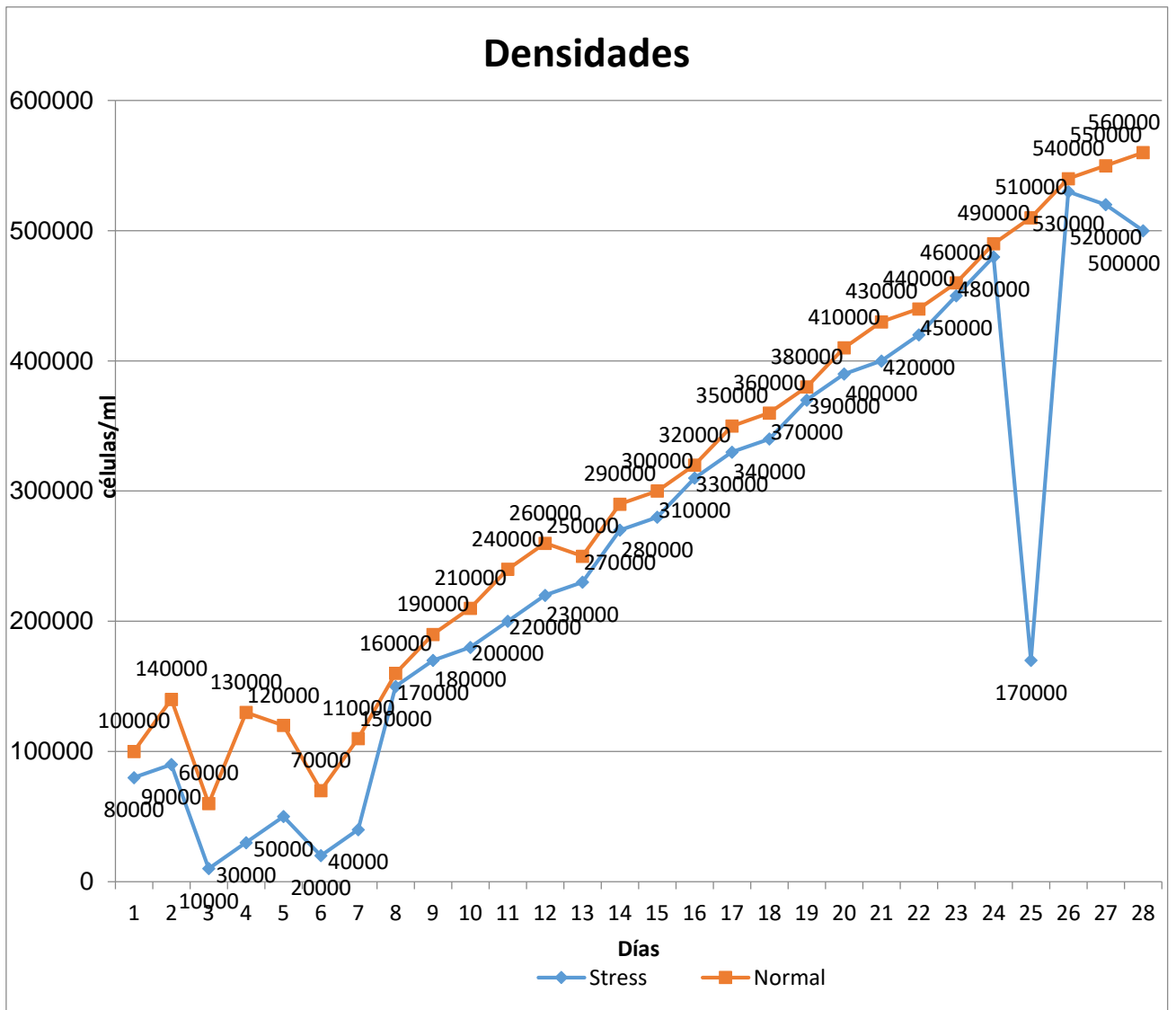


Figura 23: Curva de crecimiento durante todo el cultivo de *Nannochloris* sp.

Análisis estadístico para comparar el porcentaje de lípidos extraídos del alga

Bajo 2 condiciones de cultivo: Condición de cultivo Normal y Condición de cultivo en Estrés

1. Diseño experimental a utilizar: Diseño completamente al Azar (DCA)
2. Factor a estudiar: Condición de cultivo
3. Niveles del Factor: 2
Condición Normal (T1)
Condición de Estrés (T2)
4. Unidad Experimental: Alga
5. Variable aleatoria cuantificada: % de lípidos

Cuadro de presentación de datos:

		Peso (g)		
		T2	T1	
		14.73	12.1	
		13.5	4.63	
		10.2	9.16	
		15.4	6.86	
		7.48	12.09	
		17.55	11.34	
		13.26	8.11	
SUMA	92.12	64.29	156.41	
N	7	7	14	
MEDIA	13.16	9.184285714		

6. Cuadro de análisis de la Varianza (ANVA)

FV	SC	GL	CM
TRATAMIEN	55.32206429	1	55.32206429
ERROR	116.7943714	12	9.732864286
TOTAL	172.1164357	13	

7. Prueba "F" al 5% de significación:

a) Planteamiento de la Hipótesis

Ho: Las condiciones de cultivo tienen igual efecto en la producción de lípidos en el alga

Ha: Una de las condiciones de cultivo tiene un efecto diferente a la otra en la producción de lípidos en el alga

b) Nivel de significación: 5%

c) Determinación de Fc: 5.684047641

d) Determinación de Ft para (1,12 GL y 95% de confianza): 4.75

e) Tabla de decisión: Fc=5.6840 es mayor que Ft=4.75 la prueba es "Significativa"

f) Conclusión: se rechaza Ho es decir que unas de las condiciones de cultivo tienen un efecto diferente en la producción de lípidos en el alga

8. Prueba de "t" de Student al 5% de significación

Ho: El promedio de lípidos alcanzado en condiciones normales es igual al promedio alcanzado bajo condiciones de estrés

Ha: El promedio de lípidos alcanzado en condiciones normales es diferente al promedio alcanzado bajo condiciones de estrés

b) Nivel de significación: 5%

Sd=1.667578594

c) Determinación de tc: 2.384124083

d) Determinación de tT para (12 GL y 95% de confianza)

e) Tabla de decisión: tc=2.3841 es mayor que tT=2.179 la prueba es "Significativa"

f) Conclusión: se rechaza Ho es decir que el promedio de los lípidos son diferentes

g) Se considera al mayor promedio como aquel que supera a los demás, por lo tanto, el mayor promedio es 13.16%, es decir, se concluye que el tratamiento con estrés produce más lípidos que el cultivo a condiciones normales

Análisis estadístico para comparar el rendimiento de alga en base a biomasa seca

Bajo 2 condiciones de cultivo: Condición de cultivo Normal y Condición de cultivo en Estrés

1. Diseño experimental a utilizar: Diseño completamente al Azar (DCA)
2. Factor a estudiar: Condición de cultivo
3. Niveles del Factor: 2
Condición Normal (T1)
Condición de Estrés (T2)
4. Unidad Experimental: Alga
5. Variable aleatoria cuantificada: peso en gramos

Cuadro de presentación de datos:

				Peso (g)			
				T1	T2		
				0.3734	0.3775		
				0.3747	0.3714		
				0.3381	0.3747		
				0.4052	0.3555		
				0.3742	0.3745		
				0.1356	0.3598		
				0.1712	0.1652		
SUMA		2.1724		2.3786		4.551	
N		7		7		14	
MEDIA		0.310342857		0.3398			

6. Cuadro de análisis de la Varianza (ANVA)

FV	SC	GL	CM
TRATAMIEN	0.003037031	1	0.003037031
ERROR	0.107833517	12	0.008986126
TOTAL	0.110870549	13	

7. Prueba "F" al 5% de significación:

a) Planteamiento de la Hipótesis

Ho: Las condiciones de cultivo tienen igual efecto en la producción de biomasa del alga

Ha: Una de las condiciones de cultivo tiene un efecto diferente a la otra en la producción de biomasa del alga

b) Nivel de significación: 5%

c) Determinación de F_c : 0.337968918

d) Determinación de F_t para (1,12 GL y 95% de confianza): 4.75

e) Tabla de decisión: $F_c=0.3379$ es menor que $F_t=4.75$ la prueba es "No Significativa"

f) Conclusión: se acepta Ho es decir ambas condiciones de cultivo tienen igual efecto en la producción de biomasa del alga

8. Prueba de "t" de Student al 5% de significación no se justifica realizar la prueba por haber salido "No Significativa"

Capítulo V: Discusión

Los parámetros físico químicos nos muestra que durante toda la investigación se mantuvieron estables, el pH que se mantuvo en 6 al inicio del cultivo con algunas oscilaciones en pH 7, pero luego volvió a 6 hasta la etapa estacionaria donde se hizo la cosecha, la temperatura se mantuvo por periodos estables aumentando casi en las últimas semanas del cultivo debido al aumento de temperatura del ambiente por ser verano, esto es similar a lo que reporta María Fernanda Pulla Tenemaza (2014) en pH y temperatura, además, influyó la temperatura a que el cultivo tenga un rápido crecimiento y se lograra la fase estacionaria en menos de un mes, supongo que el aumento de pH en mi investigación se debe a que las microalgas producen metabolitos ya que también se alimentan de los nutrientes en el medio acuático y eliminan estos residuos haciendo de que el pH haya aumentado y luego de un tiempo se estabilizo y recupero su pH normal de seis.

Según María Fernanda Pulla Tenemaza, et al., (2014), logró una cosecha en un tiempo de 8 días con un cultivo de *Chlorella* sp. , a comparación con mi investigación en el cual se logró una cosecha en un tiempo de 28 días, supongo que fue por el tamaño de microalgas ya que *Nannochloris* sp. es muy pequeña a comparación de *Chlorella* sp. , además, en la otra investigación se utilizó una fuente de carbono durante el crecimiento, es por esto que en esta investigación supongo que al no utilizar una fuente de carbono constante demoro un poco más el crecimiento de *Nannochloris* sp. .

La producción obtenida en biomasa seca en esta investigación en promedio fue de 0.062 g/L para el cultivo en condiciones normales y para el cultivo en condiciones de estrés fue de 0.066 g/L, se obtuvo un menor rendimiento que Julian Libardo Sanchez Villarraga, et al., (2010), el cual obtuvo un promedio de 0.16 g/L utilizando diferentes especies de la microalga *Chlorella* pero utilizo diferentes medios de cultivo como el Guillard, Sueoka, Lixiviado 30% y Lixiviado 80%, nosotros por tema de reactivos solo empleamos el medio de cultivo Guillard F/2, esta diferencia de biomasa seca obtenido creo que se debe a que el cultivo de diferentes especies de *Chlorella* se logró en 11-13 días haciendo una cosecha muy rápida a comparación de mi cosecha que duro más de dos semanas por tema de logística con el cual no contábamos

con bomba de succión y tubos de gran volumen para la centrifugación haciendo que la microalga siguiera su etapa estacionaria muriendo muchas microalgas por entrar a la etapa de declive suponemos.

En temas de % de lípidos para la producción de biodiesel se puede observar que hay una similitud entre mis resultados que fueron de 13.16% para la biomasa seca sometida a estrés y de 9.19% para la biomasa seca sometida a condiciones normales., a los de Luis Eduardo Salazar Pérez (2012), el cual obtuvo rendimientos de 10.31% para *Chaetoceros calcitrans*, 12.67% para *Dunnaliella tertiolecta* y 6.35% para *Nannochloropsis* sp. , aplicando la misma metodología que la mía, que fue la extracción de lípidos mediante el equipo Soxhlet, demostrando que mi metodología, procedimientos y cuidado constante que tuve durante casi un mes fueron satisfactorios.

Capítulo VI: Conclusión

La microalga *Nannochloris* sp. ha demostrado ser una microalga apta como fuente para la producción de biodiesel debido a que tienen un porcentaje mayor de lípidos que los cultivos convencionales agrícolas, que existen hoy en día en muchas partes del mundo, siendo una alternativa viable para una industria futura y sostenible con el medio ambiente.

En esta investigación las microalgas fueron utilizadas como materia prima para determinar el % de lípidos para la producción de biodiesel ya que se perfilan como la fuente más adecuada debido al rápido crecimiento, alto contenido de aceite y una alta productividad, nutrientes y no compite por suelo ni con otros cultivos agrícolas.

Para poder tener éxito en el % de lípidos para la producción de biodiesel confluyen varias condiciones ambientales tales como la luz, agitación, aireación, nutrientes, temperatura, pH, etc; el control riguroso de estos parámetros es indispensable para lograr un crecimiento saludable de los cultivos.

Se realizó la curva de crecimiento de la cepa *Nannochloris* sp. bajo las dos condiciones de nutrientes, encontrándose que la mayor densidad de microalgas la tuvo las microalgas cultivadas a concentraciones normales, pero las que mejor rendimiento de lípidos para la producción de biodiesel tuvieron fueron las microalgas cultivadas bajo estrés.

El método Soxhlet demostró ser un método muy simple, fiable, eficaz y eficiente en la extracción de lípidos de la biomasa algal, es por eso que recomiendo utilizar este método para reducir costos y tiempo en una futura investigación en este tema, recomiendo contar con un protocolo de seguridad y el equipo de protección adecuado para evitar quemaduras, contaminación de las muestras o inhalación del solvente utilizado en la extracción, cabe mencionar también que este método tiene poca intervención manual a diferencia de otros métodos más sofisticados en donde el analista debe tener una mayor destreza concluyendo la probabilidad de ocurrencia de un fallo es muy probable para pruebas que no sean a través de la metodología Soxhlet.

El rendimiento más alto de lípidos para las dos concentraciones de nutrientes que se utilizó en esta investigación fue, las microalgas sometidas a estrés con un promedio de 13.16% a diferencia de las microalgas sometidas a concentraciones normales que fue de 9.19%, el cual se vio reflejado al aplicar las pruebas estadísticas pertinentes, estos resultados tienen validez ya que muchos autores como Mendoza et al., 2008, Solovchenko et al., 2008, Rodolfi et al., 2009, Takagi et al., 2000 entre otros coinciden que las microalgas sometidas a estrés tienen un mayor porcentaje de lípidos que las microalgas sometidas a concentraciones normales.

Capítulo VII: Recomendaciones

Durante la centrifugación se contó con un equipo centrifugo limitado en capacidad de separación no superaba los 100 ml por Bach, lo cual dificultó el tiempo óptimo de un día para culminar toda esta etapa en mi caso esta limitación me causo un atraso de 7 días, si hubiera separado en el tiempo estimado de un solo día podría haber aumentado aún más el porcentaje de lípidos en la microalga ya que la centrifugación se hizo en la etapa estacionaria antes de que envejezca el cultivo y pierda lípidos y otros nutrientes.

Es necesario contar con una gran variedad de especies de microalgas tanto dulceacuícolas como marinas e identificarlas por porcentaje de grasa para facilitar la elección de la microalga óptima para producción de biodiesel y para evitar hacer trámites engorrosos en IMARPE para obtener una cepa con características idóneas para producir biodiesel.

Es necesario incentivar, motivar y financiar tesis para la obtención del título profesional en el tema de microalgas ya que contamos con un buen laboratorio de cultivos menores y un especialista en el tema.

Capítulo VII: Referencias Bibliográficas

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A. & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J Biol Sci*, 19(3), 257-275. Doi: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005.

Abou-Shanab, R. A. I., Hwang, J. H., Cho, Y., Min, B., & Jeon, B. H. (2011). Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. *Applied Energy*, 88(10), 3300-3306. doi: 10.1016/j.apenergy.2011.01.060.

Acosta, L. (2000). *Uso de biodiesel en motores diesel. 5° curso teórico práctico: Producción de biodiesel a pequeña escala. Marzo 2000*. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Ajila, V. (2007) Análisis de la Legislación sobre biocombustibles en América Latina. *Olade*, 21, 5-26.

Aldo de la Cruz Benítez¹, Benito Reyes Trejo¹, Diana Guerra Ramírez, & Ramirez¹, P. G. (2013). Composición de esteres metílicos del biodiesel obtenido de semilla de Flamboyán.

Amaro, H.M., Guedes, A.C. and Malcata, F.X. (2011) Advances and Perspectives in Using Microalgae to Produce Biodiesel. *Applied Energy*, 88, 3402-3410.

Amaya, A., & Sarmiento, R. (2010). *Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas con etanolhexano empleando disrupción celular térmica y química*. Universidad Industrial de Santander.

Araujo, G. S., Matos, L. J., Fernandes, J. O., Cartaxo, S. J., Goncalves, L. R., Fernandes, F. A., & Farias, W. R. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. *Ultrason Sonochem*, 20(1). 95-98. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.027.

Bosnjaković, M. (2013). Biodiesel from algae. *Mechanics Engineering and Automation*.

Brennan, L., & Owende, P. (2010). A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009.

Bruinsma, J. (2009). The resource Outlook to 2050: by how much do land, water use and crop yields need to increase by 2050? Paper presented at the Expert meeting on how to feed the world in 2050. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiaba, S., Vonshaka, A., Cohen Z. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60(5):497-503.

Cerdeira, S.; Ceretti, H. & Reciulschi, E. Biocombustibles. Monografía Educ.ar.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25(3):294-306.

Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*, 26(3), 126-131. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.12.002.

De, B.K., Chaudhury, S., Bhattacharyya, D.K. (1999). Effect of nitrogen sources on γ -linoleic acid accumulation in *Spirulina platensis*. *JAOCS* 76(1):156.

Día 1(2005). *Pucallpa y San Martín interesa a Pure Biofuels. Día 1, suplemento de El Comercio del lunes 02 de abril del 2007.*

Diez Bellido, C. (2013). *Obtención de Bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con Pichia stipitis.* Universidad de Valladolid.

Donohue T & Cogdell R (2006) Microorganisms and clean energy. *NatRev. Microbiol.* 4: 800.

Dufey, A. (2006). *Biofuels Production, Trade and Sustainable Development: Emerging Issues.* (IIED Ed. Ilustrada ed.).

Dragone, G. D., Fernandes, B. F., Vicente, A., & Teixeira, J. A. (2010). Third generation biofuels from microalgae.

Fernández, C., Montiel, J., Milán, A., & Badillo, J. (2012). Producción de Biocombustibles a partir de algas. *RaXimhai*, 8. 101-115.

Florentino de Souza Silva, A. P., Costa, M. C., Colzi Lopes, A., Fares Abdala Neto, E., Carrhá Leitao, R., Mota, C. R., & Bezerra dos Santos, A. (2014). Comparison of pretreatment

methods for total lipids extraction from mixed microalgae. *Renewable Energy*, 63, 762-766. doi: 10.1016/j.renene.2013.10.038.

Garibay, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez, M. d. P., Serrano. L., & Martínez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas 13.

Gendy, T. S., & El-Tamtamy, S. A. (2013). Commercialization potential aspects of microalgae for biofuel production: An overview. *Egyptian Journal of Petroleum*, 22(1), 43-45. doi: 10.1016/j.ejpe.2012.07.001.

Glembin, P., Kerner, M., & Smimova, I. (2013). Cloud point extraction of microalgae cultures. *Separation and Purification Technology*, 103, 21-27. doi: 10.1016/j.seppur.2012.10.017.

González., I. A. D., Kafarov., D. V. & Monsalve., D. A. G. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. 53-60.

González, S., & Galindo, D. (2010). *Adaptación del Método Bligh y Dier a la Extracción de lípidos de microalgas nativas para la producción de Biodiesel*. Universidad Industrial de Santander.

Gordillo F.J.L. Goutx, M., Figueroa, F.L., Niell, F.X. (1998). Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *J Appl Phycol* 10(2):135-144.

Gouveia, L., Oliveira, A.C. (2009). Microalgae as a raw material for biodiesel production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(2):269-274.

Greenwell, H.C, Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J R Soc Interface* 7(46):703-726.

Hackenberg, N. (2008). Biocombustibles de Segunda Generación.

Halim, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol Adv*, 30(3), 709-732. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.001.

Hoshida, H., Ohira, T., Minematsu, A., Akada, R., Nishizawa, Y. (2005). Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO₂ concentrations. *J Appl Phycol* 17(1):29-34.

Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., & Danquah, M. K. (2010). Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*, 2010, 1-11. doi: 10.1155/2010/391632.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, Darzins, A.I. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 54(4):621-639.

MH Huesemann , and Weldy CS. 2007. "Lipid Production by *Dunaliella salina* in Batch Culture: Effects of Nitrogen Limitation and Light Intensity." *Journal of Undergraduate Research VII*: 115-122.

ITDG-CONCYTEC (2004). Producción de biodiesel a pequeña escala a partir de Recursos Oleaginosos Amazónicos.

Khozin-Goldberg, I; Bigogno, C; Shrestha, P; Cohen, Z. (2002). Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (*Trebuxiophyceae*). *J Phycol* 38(5):991-994.

Koizumi, T . (2014). *Biofuels and Food Security : Biofuel Impact on Food Security in Brazil, Asia and Major Producing Countries*. (I. Springer Ed.).

Korres, N., O'kiely, P., Benzie, J. A. H., & West, J. S. (2013). *Bioenergy Production by Anaerobic Digestion: Using Agricultural Biomass and Organic Wastes*: Taylor & Francis.

Li, Y., Qin, J.G. (2005). Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. *J Appl Phycol* 17(6):551-556.

Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q. (2008c). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green algae *Neochloris oleabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(4):629-636.

Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol* 99(11):4717-4722.

Loera-Quezada, M. & Olgúin, E. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1(1), pp 92, 93.

Loera-Quezada y Olgúin (2010) Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. **Revista Latinoam Biotecnol Amb Algal 1(1) ,91-116**

Martínez-Alcalá, Á. *Producción de bioetanol mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam explosión*. Universidad Complutense de Madrid.

Mendoza, H., Molina Cedres, C., de la Jara, A., Nordström, L., Freijanes, K., Carmona, L. (2008). Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno. *Grasas Aceites* 59(1):27-32.

Meng, Xin, Jianming Yang, Xin Xu, Lei Zhang, Qingjuan Nie, Mo Xian. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* 34 (2009) 1-5.

Morais, M. G. d., & Costa, J. A. V. (2007). Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management*, 48(7), 2169-2173. doi: 10.1016/j.enconman.2006.12.011.

Mosquera Martínez, M. J., & Merino Ruesga, L. (2006). *Empresa y energías renovables: lo que su empresa debe saber sobre energías renovables, eficiencia energética y Kioto*: Fundacion Confemetal.

Naumann, E. (1921).Algaebase: Genus name enter: Algaebase.org.
http://www.algaebase.org/search/genus/detail?genus_id=Y4c7c7e9fea03dbc4&-session=abv4:AC1F19551e0252F6B7kpD1842A2A

Olguín E.J., Galicia S., Angulo-Guerrero O. and Hernández E. (2001). The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on pig waste. *Bioresour. Technol.* 77: 19-24.

Park, J. B., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2013). Enhancing biomass energy yield from pilot-scale high rate algal ponds with recycling. *Water Res*, 47(13), 4422-4432. doi: 10.1016/j.watres.2013.04.001.

Peñarranda, M., Martínez Roldán, A., & Villanueva, R. (2013). Biodiesel Production from Microalgae: Cultivation Parameters that Affect Lipid Production. 43-68.

Perez, M. (Ed.). (2008). *Energía Sostenible: Antología de Lecturas del Instituto Tropical de Energía, Ambiente y Sociedad (ITEAS)*.

Pérez, M. J. (2014) *Evaluación cuantitativa de la producción de biodiesel de microalgas de lagunas de tratamiento de agua residual*. Tesis para obtención del título de Ingeniero Civil. Cuenca: Universidad de Cuenca.

Pulla Tenemaza María Fernanda, et al., (2014) *Línea base para el aprovechamiento de microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual*. Tesis para optar el Título de Ingeniero Civil. Cuenca-Ecuador: Universidad de Cuenca.

Quin, J. (2005). Bio Hydrocarbons from Algae Impacts of temperature, light and salinity on algae growth. Barton, Australia Rural Industries Research and Development Corporation.

Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., Posewitz, MC. (2010). Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. *Eukaryotic Cell* 9 (4): 486-501.

Ramluckand, K., Moodley, K. G., & Bux, F. (2014). An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel*, 116, 103-108. Doi:10.1016/j.fuel.2013.07.118.

Rodolfi, L., Zitelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102(1):100-112.

Rosenberg, J.N., Oylerl, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Biotechnol* 19(5):430-436.

Ruiz, A. (2011). *Puesta en marcha de un Cultivo de Microalgas para la eliminación de nutrientes de un Agua Residual Urbana previamente tratada anaeróbicamente*. (Master). Universidad Politécnica de Valencia.

Salazar Pérez Luis Eduardo. (2012) *Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel*. Tesis para optar el Título de Ingeniero Industrial y de Sistemas. Piura: Universidad de Piura.

Sánchez-Varo (1996): Biotecnología de las microalgas. Universidad de California, Estados Unidos.

Sanchez Villarraga Julian Libardo, et al., (2010) *Evaluación de las condiciones de cultivo de la microalga (Chlorella sorokiniana) para la producción de biodiesel*. Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Barcelona-Colombia: Universidad de los Llanos.

Sandoval, P. (2010). La Eficiencia Energética en Edificios. La Nueva Directiva Comunitaria.

Sandoval, G. (2010). Biocombustibles avanzados en México: estado actual y perspectivas.

Sathish, A. (2012). *Biodiesel Production From Mixed Culture Algae Via a Wet Lipid Extraction Procedure*. (Master of Science (MS) in Biological Engineering), Utah State University. Retrieved from <http://digitalcommons.usu.edu/etd/1372>.

Sheehan J, Dunahay, Benemann, T. J, Roessler, P. (1998). A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae. Close-out report. National Renewable Energy Lab, Department of Energy, Golden, Colorado, U.S.A. Report number NREL/TP-580-24190, dated July 1998.

Shenk M., Stephens E., Posten C., Kruse O. (2009). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production.

Shifrin, N., Chisholm. S. (1980). Phytoplankton lipids: environmental influences on production and possible commercial applications. In: (Shelef, G., Soeder, C. eds.) *Algal Biomass* Elsevier, Amsterdam, pp. 627-645.

Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M.N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J Appl Phycol* 20(3):245-251.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101(2):87-96.

Sutherland, D. L., Tumbull, M. H., & Craggs, R. J. (2014). Increased pond depth improves algal productivity and nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds. *Water Res*, 53, 271-281. doi: 10.1016/j.watres.2014.01.025.

Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A. H., Haik, Y., & Farid, M. (2014). Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel. *Biomass and Bioenergy*, 1-9. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.02.034.

Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K., Yoshida, T. (2000). Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Appl Microbiol Biotechnol* 54(1):112-117.

Takagi, M., Karseno, S., Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J Biosci Bioeng* 101(3):223-226.

Tornabene, T.G., Holzer, G., Lien S., Burris, N. (1983). Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb Tech* 5(6):435-440.

Vásquez, C. A. (2016) Los Biocombustibles: Desarrollos recientes y tendencias internacionales. *Gerencia de Políticas y Análisis Económico (OSINERGMIN)*,36, 42-43.

Vértiz, D. L. (2009) *Análisis Técnico y Económico sobre producción, almacenamiento y transporte de biodiesel en el Perú*. Tesis para Título de Ingeniero Mecánico-Eléctrico. Lima: Universidad de Piura.

Weldy, C., & Huesemann, M. (2007). Lipid production by *dunaliella salina* in batch culture effect of nitrogen limitation and light intensity *Journal of Undergraduate. Department of Energy Journal of Undergraduate Research*.

Xiong, W., Li, X., Xiang, J., Wu, Q. (2008). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(1):29-36.

Zhang, Y. (2003). Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresour Technol*, 89(1), 1-16. doi: 10.1016/s0960-8524(03)00040-3.

