



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“OBTENCIÓN DE BIODIESEL DE TERCERA GENERACIÓN A  
PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL  
CULTIVO DE LA MICROALGA *CHLORELLA SP* DE ORIGEN  
MARINO. “**

**AUTORES:**

**TERÁN AGUILERA DENIS MANUEL**

**POSADA ESPINOZA MARCOS WELLINGTON**

**TUTOR:**

**DRA. MIRELLA BERMEO GARAY**

**GUAYAQUIL, ABRIL DEL 2019**



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL  
TÍTULO DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“OBTENCIÓN DE BIODIESEL DE TERCERA GENERACIÓN A  
PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL  
CULTIVO DE LA MICROALGA *CHLORELLA SP* DE ORIGEN  
MARINO.”**

**AUTORES:**

**TERÁN AGUILERA DENIS MANUEL  
POSADA ESPINOZA MARCOS WELLINGTON**

**TUTOR:**

**DRA. MIRELLA BERMEO GARAY**

**GUAYAQUIL, ABRIL DEL 2019**

## UNIDAD DE TITULACIÓN



Presidencia  
de la República  
del Ecuador



Plan Nacional  
de Ciencia, Tecnología,  
Innovación y Saberes



SENESCYT  
Secretaría Nacional de Educación Superior,  
Ciencia, Tecnología e Innovación

<b>REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA</b>		
<b>FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACIÓN</b>		
<b>TÍTULO Y SUBTÍTULO:</b>	<b>OBTENCIÓN DE BIODIESEL DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL CULTIVO DE LA MICROALGA <i>CHLORELLA SP</i> DE ORIGEN MARINO.</b>	
<b>AUTOR(ES)</b> (apellidos/nombres):	Terán Aguilera Denis Posada Espinoza Marcos	
<b>REVISOR(ES)/TUTOR(ES)</b> (apellidos/nombres):	Tutora: Dra. Martha Bermeo Garay. Revisor: Ing. Gonzalo Villa Manosalvas.	
<b>INSTITUCIÓN:</b>	Universidad de Guayaquil	
<b>UNIDAD/FACULTAD:</b>	Facultad de Ingeniería Química.	
<b>MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:</b>		
<b>GRADO OBTENIDO:</b>	Ingeniero Químico	
<b>FECHA DE PUBLICACIÓN:</b>	<b>No. DE PÁGINAS:</b>	78
<b>ÁREAS TEMÁTICAS:</b>	Ingeniería y Tecnologías Químicas	
<b>PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:</b>	Biodiesel, <i>Chlorella sp</i> , lípidos, concentración de biomas, transesterificación.	
<b>RESUMEN/ABSTRACT:</b> El presente proyecto tiene como finalidad la obtención de biodiesel de tercera generación a partir de los lípidos del cultivo de la microalga <i>Chlorella sp</i> de origen marino como alternativa para suplir la dependencia de los combustibles fósiles. El estudio realizado consistió en cuatro fases realizadas a nivel de laboratorio, desde la adecuación del medio de cultivo, el control de la concentración celular mediante el método de conteo en la cámara de Neubauer, siendo en la fase estacionaria, la óptima para la recolección de la biomasa. Seguidamente de la recolección se procedió a secar la biomasa, luego se hizo la destrucción celular para la liberación de los lípidos. Se empleó el método de Soxhlet para la extracción del aceite de microalga, el cual se analizó por cromatografía de gases (CG-FID), mostrando ácidos grasos significativos de carbonos 16-20 ideal para la transesterificación. Finalmente, el aceite se transesterificó para obtener biodiesel. El cultivo de <i>Chlorella sp</i> presentó en peso seco una tasa de aumento de biomasa por día de 0,26 con una productividad de 0.126 (g bs/ g * día) y se obtuvo 435 miligramos de biodiesel por cada gramo de aceite microalgal, el mismo que presentó un poder calorífico de 9457 kCal/kg similar al documento de Pérez,2016; también mostró características de carbón residual de 0,10 %(P) y viscosidad cinemática a 40 °C de 4,14 Cst establecidos como requisitos en la NTE INEN 1489:99 como diésel tipo 2, de igual manera según su °API y gravedad específica se determinó como un crudo pesado.		
<b>ADJUNTO PDF:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
<b>CONTACTO CON AUTOR/ES:</b>	<b>Teléfono:</b>	Terán Denis 0981811147 E-mail: spapu_1991@hotmail.com Posada Marcos 0981186870 marcos.2802_g@hotmail.com
<b>CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:</b>	<b>Nombre:</b> UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL	
	<b>Teléfono:</b> (04) 228-7072, 228-7258, 222-8695, 228-4505	
	<b>E-mail:</b> ugrector@ug.edu.ec	



Universidad de Guayaquil

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
UNIDAD DE TITULACIÓN

CERTIFICADO DE PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrado DRA. MIRELLA BERMEO GARAY, tutor del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por DENIS MANUEL TERÁN AGUILERA, C.I.: 1720388600, y MARCOS WELLINGTON POSADA ESPINOZA, C.I.: 0927218545 con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de INGENIERO QUIMICO. Se informa que el trabajo de titulación: 'OBTENCIÓN DE BIODIESEL DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL CULTIVO DE LA MICROALGA *CHLORELLA SP* DE ORIGEN MARINO', ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa anti-plagio (URKUND) quedando el 3% de coincidencia.

<https://secure.orkund.com/view/47362133-245492-576584>

NOMBRE DEL DOCENTE TUTOR

CI: 0905104790



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**UNIDAD DE TITULACIÓN**

**LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA  
EL USO NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO  
ACADÉMICOS**

Nosotros, DENIS MANUEL TERÁN AGUILERA, C.I.: 1720388600, y MARCOS WELLINGTON POSADA ESPINOZA, C.I: 0927218545 certificamos que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es "OBTENCIÓN DE BIODIESEL DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL CULTIVO DE LA MICROALGA *CHLORELLA SP* DE ORIGEN MARINO" son de mi absoluta propiedad y responsabilidad Y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN\*, autorizo el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines no académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente.

\*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
UNIDAD DE TITULACIÓN**

**CERTIFICACIÓN DEL TUTOR REVISOR**

Habiendo sido nombrado GONZALO VILLA MANOSALVAS tutor del trabajo de titulación **“OBTENCIÓN DE BIODIESEL DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL CULTIVO DE LA MICROALGA *CHLORELLA SP* DE ORIGEN MARINO”** certifico que el presente trabajo de titulación, elaborado por **TERÁN AGUILERA DENIS MANUEL**, con cédula de identidad N° **1720388600** y **POSADA ESPINOZA MARCOS WELLINGTON** con cédula de identidad N° **0927218545**, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Ingeniero Químico, en la Carrera de Ingeniería Química Facultad de Ingeniería Química, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apto para su sustentación.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecerle a Jehová mi Dios, a mi Padre Jesucristo por las bendiciones recibidas por su misericordia y su gracia, brindándome las oportunidades y guiándome por el camino correcto para alcanzar mis metas, porque a través de su amor me ha dado la inteligencia para lograr con éxito este proceso en mi vida.

A mi amada familia, quienes, mediante sus consejos y enseñanzas me han permitido ser una persona correcta, con principios y valores, siendo ellos mi mayor motivación de vida, que cada día me impulsaban a dar todo de mí, quienes confiaron en mi y en respuesta, a obtener el título de Ingeniero Químico.

A mis estimados Docentes, quienes, con paciencia, dedicación y amor hacia el educando trabajaban para formar profesionales comprometidas al servicio de los demás y en beneficio de un mejor país.

A mis compañeros, a mis futuros colegas, con quienes compartimos alrededor de 5 años en las aulas, pero todo tiene que continuar, les deseo éxito en sus vidas.

“Dar con amor es el mejor regalo que te das a ti mismo”

**Marcos Wellington Posada Espinoza**

## **DEDICATORIA**

Primero a Jehová mi Dios, luego a mi familia y a mí mismo. Quisiera dedicarle a mis Docentes porque de ellos aprendí que en la vida todo conlleva un proceso, de respetarse a uno mismo y a los demás, de que, para cumplir con tus ideales, se necesita de preparación continua, esto te permitirá obtener un crecimiento en la vida, siendo que el camino es extenuante pero la recompensa, la más gratificante y satisfactoria.

“Has lo correcto, que tus acciones hablen por ti.”

**Marcos Wellington Posada Espinoza**

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“OBTENCIÓN DE BIODIESEL DE TERCERA GENERACIÓN A  
PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DEL  
CULTIVO DE LA MICROALGA *Chlorella sp* DE ORIGEN MARINO”.**

**Autores:**

Terán Aguilera Denis Manuel

Posada Espinoza Marcos Wellington

**Tutora:**

Dra. Martha Mirella Bermeo Garay

**RESUMEN**

El presente proyecto tiene como finalidad la obtención de biodiesel de tercera generación a partir de los lípidos del cultivo de la microalga *Chlorella sp* de origen marino como alternativa para suplir la dependencia de los combustibles fósiles. El estudio realizado consistió en cuatro fases realizadas a nivel de laboratorio, desde la adecuación del medio de cultivo, el control de la concentración celular mediante el método de conteo en la cámara de Neubauer, siendo en la fase estacionaria, la óptima para la recolección de la biomasa. Seguidamente de la recolección se procedió a secar la biomasa, luego se hizo la destrucción celular para la liberación de los lípidos. Se empleó el método de Soxhlet para la extracción del aceite de microalga, el cual se analizó por cromatografía de gases (CG-FID), mostrando ácidos grasos significativos de carbonos 16-20 ideales para la transesterificación. Finalmente, el aceite se transesterificó para obtener biodiesel. El cultivo de *Chlorella sp* presentó en peso seco una tasa de aumento de biomasa por día de 0,26 con una productividad de 0.126 (g bs/ g \* día) y se obtuvo 435 miligramos de biodiesel por cada gramo de aceite microalgal, el mismo que presentó un poder calorífico de 9457 kCal/kg similar al documento de Pérez,2016; también mostró características de carbón residual de 0,10 %(P) y viscosidad cinemática a 40 °C de 4,14 Cst establecidos como requisitos en la NTE INEN 1489:99 como diésel tipo 2, de igual manera según su °API y gravedad específica se determinó como un crudo pesado.

**Palabras claves:** biodiesel, *Chlorella sp*, lípidos, concentración de biomasa transesterificación.

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“OBTENTION OF THIRD GENERATION BIODIESEL FROM THE  
PRODUCTION OF THE LIPID CONTENT OF THE MICROALGA  
CULTIVATION *Chlorella sp* OF MARINE ORIGIN”**

**Authors:**

Terán Aguilera Denis Manuel

Posada Espinoza Marcos Wellington

**Advisor:**

Dra. Martha Mirella Bermeo Garay

**SUMMARY**

The purpose of this project is to obtain third generation biodiesel from the lipids of the *Chlorella sp* microalgae culture of marine origin as an alternative to replace the dependence on fossil fuels. The study carried out consisted of four phases carried out at the laboratory level, from the adaptation of the culture medium, the control of the cellular concentration by means of the counting method in the Neubauer chamber, being in the stationary phase, the optimum for the collection of the biomass. After harvesting the biomass was dried, then cell destruction was done for lipid release. The Soxhlet method was used to extract the microalga oil, which was analyzed by gas chromatography (GC-FID), showing significant fatty acids of 16-20 carbons ideal for transesterification. Finally, the oil was transesterified to obtain biodiesel. The cultivation of *Chlorella sp* presented in dry weight a rate of increase of biomass per day of 0.26 with a productivity of 0.126 (g bs / g \* day) and 435 milligrams of biodiesel was obtained for each gram of microalgal oil, the same which presented a calorific power of 9457 kCal / kg similar to the Pérez document, 2016; also showed residual carbon characteristics of 0.10% (P) and kinematic viscosity at 40 °C of 4.14 Cst established as requirements in NTE INEN 1489: 99 as diesel type 2, in the same way according to its  $\Delta$ API and specific gravity determined as a heavy oil.

**Keywords:** biodiesel, *Chlorella sp*, lipids, biomass concentration, transesterification.

## ÍNDICE

PORTADA.....	I
REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA.....	III
CERTIFICADO DE PORCENTAJE DE SIMILITUD .....	IV
LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE .....	V
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR REVISOR .....	VI
AGRADECIMIENTO.....	VII
DEDICATORIA.....	VIII
RESUMEN .....	IX
SUMMARY .....	X
INTRODUCCIÓN .....	1
1. CAPÍTULO 1.....	4
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	4
1.1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
1.2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO .....	5
1.2.1. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA.....	5
1.2.2. JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA.....	6
1.2.3. JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA.....	6
1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	6
1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS .....	7
1.4. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
1.5. HIPÓTESIS GENERAL.....	10
1.6. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS .....	10
1.7. VARIABLE INDEPENDIENTE:.....	11
1.8. INDICADORES .....	11

1.9. VARIABLE DEPENDIENTE: .....	11
1.10. INDICADORES .....	11
1.11. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES .....	12
2. CAPITULO II .....	13
2.1. MARCO DE REFERENCIA .....	13
2.1.1. MARCO TEÓRICO .....	13
2.1.2. MARCO CONCEPTUAL .....	18
2.1.3. MARCO CONTEXTUAL.....	19
2.1.3.1. Delimitación espacial.....	20
2.1.3.2. Delimitación temporal .....	20
2.1.3.3. Delimitación del contenido.....	20
2.1.3.4. Campo .....	20
3. CAPITULO III .....	21
3.1. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....	21
3.2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS .....	24
3.2.1. Materiales .....	24
3.2.2. Reactivos.....	25
3.2.3. Equipos.....	26
3.3. PROCEDIMIENTO .....	27
4. CAPITULO IV .....	50
4.1. RESULTADOS.....	50
4.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	56
4.3. CONCLUSIONES.....	60
4.4. RECOMENDACIONES .....	62
4.5. ABREVIATURAS.....	63
4.6. BIBLIOGRAFÍA .....	64
ANEXOS .....	67

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Célula de Chlorella Sp. ....	14
Ilustración 2. Reacción general de transesterificación .....	17
Ilustración 3. Comprobación de presencia de cloro con O-tolidine.....	28
Ilustración 4. Vitaminas - Nutrientes mayores - Metales. ....	29
Ilustración 5. Etapas en la producción de algas. ....	31
Ilustración 6. Representación de inóculo de 10 litros en fase exponencial al noveno día con una concentración celular de 13.850.000 (cel/ml).....	32
Ilustración 7. Representación de cultivo de 100 litros en el momento de escalar con una concentración celular de 750.000 (cel/ml) .....	32
Ilustración 8. Representación de cultivo de 100 litros en el segundo día con una concentración celular de 2.900.000 (cel/ml) .....	33
Ilustración 9. Representación de cultivo de 100 litros en el quinto día con una concentración celular de 10.250.000 (cel/ml).....	33
Ilustración 10 Representación de cultivo de 500 litros en el momento de escalar con una concentración celular de 1.750.000 (cel/ml) .....	34
Ilustración 11 Representación de cultivo de 500 litros en el segundo día con una concentración celular de 2.900.000 (cel/ml) .....	34
Ilustración 12 Representación de cultivo de 500 litros en el cuarto día con una concentración celular de 8.250.000 (cel/ml).....	35
Ilustración 13 Representación de inóculo de 500 litros en fase exponencial al décimo día con una concentración celular de 13.650.000 (cel/ml).....	35
Ilustración 14 Representación de lectura en la cámara de Neubauer .....	36
Ilustración 15. Conteo de microalgas en microscopio con aumento de 40x .....	37
Ilustración 16. Biomasa húmeda recolectada.....	38
Ilustración 17 Medición de pH .....	38
Ilustración 18 Presencia de biomasa en el cultivo .....	39
Ilustración 19. Floculación de microalgas con polielectrolito .....	39
Ilustración 20 Preparación de viales con muestra de microalga.....	40
Ilustración 21 Representación de biomasa centrifugada .....	40
Ilustración 22 Biomasa a 60°C en la estufa eléctrica .....	41

Ilustración 23 Medición de biomasa seca.....	42
Ilustración 24. Soxhlet .....	42
Ilustración 25. Extracción lipídica de microalga.....	43
Ilustración 26. Procedimiento de separación de líquidos en el Rotavapor .....	44
Ilustración 27. Medición de gramos de aceite y reactivos. ....	45
Ilustración 28 Aceite microalga - Metanol - KOH.....	45
Ilustración 29 Preparación del sistema para transesterificación catalítica.....	46
Ilustración 30. Obtención de biodiesel.....	46
Ilustración 31. Metilesteres y glicerina.....	47
Ilustración 32. Purificación de metilesteres .....	47
Ilustración 33 Biomasa Microalga.....	48
Ilustración 34 Aceite microalgal.....	53
Ilustración 35 Biodiesel a partir de microalgas .....	55

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Tasa específica de crecimiento.....	52
Gráfica 2. Curva de crecimiento del cultivo de 10 litros.....	56
Gráfica 3. Curva de crecimiento del cultivo de 100 litros.....	56
Gráfica 4. Curva de crecimiento del cultivo de 500 litros.....	57
Gráfica 5 Lípidos totales aceite microalga.....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Matriz de consistencia .....	8
Tabla 2.Operacionalización de las variables .....	12
Tabla 3. Contenido Lipídico algunas microalgas. ....	15
Tabla 4 Cultivo de 10 litros .....	50
Tabla 5 Cultivo de 100 litros .....	51
Tabla 6 Cultivo de 500 litros .....	51
Tabla 7. Tasa específica de crecimiento de biomasa en la fase del cultivo. ....	52

Tabla 8 Ácidos grasos saturados e insaturados obtenidos del ensayo en laboratorios U.B.A. ....	54
Tabla 9 Análisis realizados a muestra de biodiesel a partir de microalga .....	55
Tabla 10. Tabla comparativa del biodiesel con el diésel convencional .....	59

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

ANEXO A INFORMES .....	67
ANEXO B TABLA COMPARATIVA .....	70
ANEXO C CÁLCULOS.....	71
ANEXO D MEDIO DE CULTIVO GUILLAR “F/2” .....	72
ANEXO E NORMATIVA .....	74
ANEXO F FOTOGRAFÍA DE REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN.....	75

## INTRODUCCIÓN

El aumento de la demanda mundial de energía proveniente de los combustibles fósiles crea dependencia del petróleo y numerosos problemas medio ambientales como el calentamiento global (Nuñez Castellanos, 2017). Actualmente existe una tendencia a nivel internacional hacia la búsqueda de combustibles más limpios y nuevas fuentes de energía como la solar, la hidroeléctrica y los biocombustibles, entre otras; las mismas que están siendo evaluadas con sus propias ventajas y problemas. El biodiesel es un combustible que tiene la finalidad de reemplazar al gasóleo o diésel de petróleo, compuesto por una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAME) de cadena larga (C14 - C22), logrados de la transesterificación de aceites vegetales, grasas animales, aceites usados o lípidos de microalgas (Arias Peñaranda, Martínez, & Cañizares, 2013).

Además, el biodiesel obtenido de microalgas es una opción atractiva para producir biocombustibles, ya que estas microalgas crecen de manera muy rápida, teniendo un tiempo de reproducción celular de 1 a 10 días, también dependiendo de la especie presentan un alto contenido de lípidos que muchas veces supera la mitad de las células en base seca. Para llevar a cabo estos cultivos se necesitan pequeñas cantidades de tierra y resulta entre 15 a 300 veces más factible la producción al utilizar las microalgas que realizar cultivos vegetales para la obtención de biodiesel, asimismo estos microorganismos presentan un buen porcentaje de captación de dióxido de carbono. Estas investigaciones en microalgas se dieron desde la crisis energética y se sigue estudiando hasta la presente (Palacios, 2013).

Por consiguiente, estas microalgas tienen la facultad de multiplicarse rápidamente y captar dióxido de carbono para que su proceso de fotosíntesis sea más eficaz que el de otros cultivos destinados para producir biodiesel. Las ventajas del uso de microalgas para la obtención de biodiesel ya han sido demostradas, sin embargo, aún no se ha definido una cepa ideal, debido a la

diversidad de factores que influyen en la productividad de los lípidos y por ende en el costo de producción del biodiesel. Estos factores hacen que el costo de producción de biodiesel sea elevado. Esta dificultad para la obtención de este biodiesel de tercera generación se espera sea mitigada con el avance de la tecnología (Arias Peñaranda et al., 2013).

Por lo tanto, el primordial conflicto para el progreso de un proceso de elaboración de biodiesel de microalgas es la captación del contenido lipídico de estas micro células a un costo factible. La elección de la mejor cepa y las adecuadas condiciones de cultivo para obtener la mayor tasa de obtención de lípidos con un buen perfil de ácidos grasos que den una buena calidad al biodiesel, también se puede comercializar los variados subproductos que resultan de estos procesos como la torta de biomasa luego de la extracción lipídica y la glicerina resultante de la transesterificación, así mismo para obtener rentabilidad del proceso se debe disminuir los gastos de producción en sus diversas etapas y la transformación a biodiesel (Arias Peñaranda et al., 2013).

Por esta razón diversos científicos han puesto su interés en *Chlorella sp*, debido a que es una opción atrayente para generar biodiesel pues a pesar de que hay otras especies que producen una mayor densidad celular como la mencionada, *Chlorella sp* tiene una capacidad extraordinaria para desarrollarse a partir de diversos tipos de sustratos, también posee una gran capacidad de adaptación a diversas circunstancias ambientales, todas estas condiciones son de vital importancia a la hora de elegir una cepa como la más indicada para obtener este tipo de biocombustibles (Montero-Sánchez et al., 2012).

La metodología cuantitativa de este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de aguas y medio ambiente de nuestra facultad y se dividió en cuatro fases experimentales. La primera fase fue la adecuación del área donde se desarrolló el cultivo de la microalga *Chlorella sp*, luego el escalamiento de pequeña escala a gran escala, en la segunda fase se recopiló la mayor cantidad de biomasa, en la tercera fase se realiza la extracción de lípidos por medio de un extractor Soxhlet empleando un disolvente orgánico. En la última fase se realiza el proceso de transesterificación catalítica produciéndose biodiesel. El propósito

fundamental de este proyecto es obtener biodiesel a partir del contenido lipídico de *Chlorella sp*, mediante la reacción de transesterificación entre los esteres metílicos de ácidos grasos conseguidos en el aceite microalgal y un metóxido.

# 1. CAPÍTULO 1

## 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El daño que se evidencia en el medio ambiente, ecosistemas y la contaminación de los recursos naturales abióticos, explotación sin control de los recursos no renovables, son temas preocupantes que han originado problemas en el incremento del cambio climático. Por tanto cuando nos referimos a los combustibles fósiles, nace la incertidumbre sobre la sostenibilidad del uso actual y futuro de los mismos, debido a esto se tiende a buscar fuentes de energía limpia, alternativas y sostenibles que lleven de la mano a impactos positivos para el medio ambiente y a la economía de la sociedad (Bermeo Castillo, 2011).

Por lo tanto, los biocombustibles son una opción atractiva a esta crisis energética-medioambiental ya que estas nuevas fuentes de energías son biológicas con ventajas favorables para el medio ambiente como ser biodegradables, renovables y la más significativa es que no contribuyen el aumento de las emisiones de dióxido de carbono que tienden a acentuarse en las capas atmosféricas. Obtener biodiesel de aceites vegetales tiene problemas con la necesidad de las tierras, grandes cantidades de aguas y mano de obra para sembrar. (Montero-Sánchez et al., 2012).

Además el usar estas microalgas como principio de energía renovable ha sido de mucho interés para las comunidades científicas a nivel mundial, a través del aprovechamiento del contenido de los lípidos presentes en el aceite de las microalgas ideales para la producción de biodiesel, estas nuevas fuentes biológicas proporcionan una opción viable para dar una solución a la demanda energética y medio ambiental que ocurre como consecuencia de la demanda de los combustibles fósiles convencionales (Montero-Sánchez et al., 2012).

### 1.1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Será posible obtener biodiesel a través de la transesterificación catalítica mediante la extracción del lípido de la biomasa de la microalga *Chlorella sp.*?

## **1.2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

### **1.2.1. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA**

En la preocupación de conservar el medio ambiente, se pretende explorar la obtención de combustibles alternativos, la justificación del trabajo de investigación se realizó mediante el estudio de la utilización de las microalgas para generar biodiésel, a través de métodos de cultivo y extracción de componentes, además de reacciones químicas necesarias para la obtención de biocombustible, analizar sus características principales en comparación con combustibles convencionales.

Por esta razón surge el interés en utilizar estas microalgas para generar biodiesel mediante el aprovechamiento de la cantidad de lípidos que se encuentran en las estructuras celulares de algunas especies, el aceite que se obtiene de estas microalgas debe tener un alto contenido de triglicéridos (TG) no polares debido a que son los compuestos ideales para obtener biodiesel, la producción de estos (TG) puede ser manejada por adecuaciones en las distintas condiciones en que se mantenga el cultivo de estos microorganismos (Arias Peñaranda et al., 2013).

Por consiguiente, a los lípidos obtenidos del aceite microalgal se le realiza la reacción de transesterificación que es la conversión de triglicéridos polares en ésteres-alquílicos, este proceso para que se realice necesita de reactivo un alcohol que puede ser metanol o etanol dado el caso en su utilización y un catalizador (una base o un ácido), logrando glicerol como producto adicional de esta reacción. Los compuestos que se obtienen originalmente de este proceso son moléculas lineales del éster que es el biodiesel y están compuestas por ésteres de ácidos grasos y el alcohol. El proceso de transesterificación demanda tres moles de alcohol por un mol de triglicéridos que da como resultado un mol de glicerol y tres moles de metil ésteres que es básicamente el biodiesel obtenido (Tejeda-Benítez, Henao-Argumedo, Alvear-Alayón, & Castillo-Saldarriaga, 2015).

## **1.2.2. JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA**

El desarrollo de este trabajo de investigación aportará información referente a la generación de biodiesel mediante la utilización de microalgas como materia prima, tomando como referencias investigaciones científicas de obtención de biodiesel a partir de microalgas realizadas a nivel mundial. Este proyecto se realizará mediante experimentación a escala de laboratorio, donde se describirá las etapas realizadas, por medio de un cultivo adecuado para lograr una alta productividad de lípidos que se extraerá de la biomasa para que luego se transforme a través de una reacción catalítica en biodiesel.

## **1.2.3. JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA**

Este proyecto pretende beneficiar a la sociedad en la incorporación de energías limpias y renovables que son amigables con el medio ambiente, también favorecer en la generación de nuevos métodos para fabricar biocombustibles y generan puestos de trabajo que contribuyan a mejorar la economía del lugar donde se desarrolle el trabajo. Este tipo de biocombustibles utilizan eficientemente el área de terreno para su producción y no ponen en riesgo la seguridad alimentaria; luego de ser aprovechada la biomasa utilizada se puede lograr otras utilidades como a la industria farmacéutica. Asimismo, la *Chlorella* tiene un alto valor nutricional, se utiliza como protección contra la insuficiencia renal. También existen especies de microalgas que pueden ser utilizadas como alimento para animales (Palacios, 2013).

## **1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

- Obtener biodiesel a partir del contenido lipídico de la biomasa de la microalga *Chlorella sp.*

### **1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Realizar un cultivo a gran escala de microalga de *Chlorella sp.*
- Extraer y determinar la productividad del contenido lipídico de la biomasa de la microalga *Chlorella sp.*
- Caracterizar el perfil bioquímico del aceite microalgal mediante cromatografía de gases acoplado a detección de ionización de llama (CG-FID).
- Producir y caracterizar el biodiesel mediante transesterificación catalítica a nivel de laboratorio.

### **1.4. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

El presente trabajo de investigación consta de la parte teórica y práctica experimental que fue desarrollada en un tiempo aproximado de cuatro meses en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Química.

En la parte experimental, se determinó las condiciones óptimas de cultivo, seguido del crecimiento celular para la recolección masiva de biomasa, siendo el potencial de producción de lípidos lo requerido del aceite que tiene inmersa en su interior estas células, siendo la biomasa el componente principal para la obtención del biodiesel a través de la transesterificación catalítica, estableciendo la investigación viable a nivel de laboratorio.

En el trabajo de investigación se fundamentó en revistas, libros, artículos científicos, de cultivo, producción y cosecha de *Chlorella sp* origen marina, extracción de aceite microalga de la especie ya mencionada, en base a diversos métodos y la producción de biodiesel.

Tabla 1. Matriz de consistencia

<b>PROBLEMA</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>HIPÓTESIS GENERAL</b>
¿Será posible obtener biodiesel a través de la transesterificación catalítica mediante la extracción del lípido de la biomasa de la microalga <i>Chlorella sp.</i> ?	Obtener biodiesel a partir del contenido lipídico de la biomasa de la microalga <i>Chlorella sp</i>	Desarrollar un gran cultivo de microalga <i>Chlorella sp</i> , posteriormente recolectar la biomasa para extraer el contenido lipídico por medio del método Soxhlet, luego transformar el aceite mediante transesterificación catalítica en biodiesel de tercera generación.
	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>HIPÓTESIS ESPECÍFICAS</b>
	Realizar un cultivo a gran escala de microalga de <i>Chlorella sp.</i>	Elaborar un cultivo de 1000 litros de la microalga <i>Chlorella sp</i> en condiciones controladas de temperatura, nutridas con el medio de cultivo Guillar F/2, aireación constante y una luminosidad de 5000 lux o más, determinando la concentración celular por el método de conteo utilizando la cámara de Neubauer, alcanzando la mayor concentración celular en la fase exponencial.
	Extraer y determinar la productividad del contenido lipídico de la biomasa de la microalga <i>Chlorella sp.</i>	Obtener el contenido lipídico de la biomasa de la microalga mediante el método Soxhlet utilizando la biomasa seca con un disolvente orgánico (n-hexano) consiguiendo la productividad de aceite de <i>Chlorella sp</i> por cada kilogramo de biomasa seca obtenida.

<b>PROBLEMA</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>HIPÓTESIS GENERAL</b>
	Caracterizar el perfil bioquímico del aceite microalgal mediante cromatografía de gases acoplado a detección de ionización de llama (CG-FID).	Determinar mediante cromatografía de gases acoplado a detección de ionización de llama el perfil de ácidos grasos (FAME's) por medio del método de análisis AOCS Ce1B-89.
<b>PROBLEMA</b>	<b>OBJETIVO ESPECÍFICO</b>	<b>HIPÓTESIS GENERAL</b>
	Producir y caracterizar el biodiesel mediante transesterificación catalítica a nivel de laboratorio.	Realizar la transesterificación con metanol e hidróxido de potasio, luego efectuar los métodos de ensayo de: poder calorífico, densidad °API, gravedad específica, carbón residual, punto de inflamación, viscosidad cinemática a 40° C al biodiesel obtenido.

Fuente: (Terán-Posada,2018).

## 1.5. HIPÓTESIS GENERAL

Desarrollar un gran cultivo de microalga *Chlorella sp*, posteriormente recolectar la biomasa para extraer el contenido lipídico por medio del método Soxhlet, luego transformar el aceite mediante transesterificación catalítica en biodiesel de tercera generación.

## 1.6. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- Elaborar un cultivo de 1000 litros de la microalga *Chlorella sp* en condiciones controladas de temperatura, nutridas con el medio de cultivo Guillard F/2, aireación constante y una luminosidad de 5000 lux o más, determinando la concentración celular por el método de conteo utilizando la cámara de Neubauer, alcanzando la mayor concentración celular en la fase exponencial.
- Obtener el contenido lipídico de la biomasa de la microalga mediante el método Soxhlet utilizando la biomasa seca con un disolvente orgánico (n-hexano) consiguiendo la productividad de aceite de *Chlorella sp* por cada kilogramo de biomasa seca obtenida.
- Determinar mediante cromatografía de gases acoplado a detección de ionización de llama el perfil de ácidos grasos (FAME's) por medio del método de análisis AOCS Ce1B-89.
- Realizar la transesterificación con metanol e hidróxido de sodio, luego efectuar los métodos de ensayo de: poder calorífico, densidad °API, gravedad específica, carbón residual, punto de inflamación, viscosidad cinemática a 40° C al biodiesel obtenido.

### **1.7. VARIABLE INDEPENDIENTE:**

- Potencial de producción de lípidos de la microalga *Chlorella sp.*

### **1.8. INDICADORES**

- Determinación de lípidos.
- Análisis del aceite de microalgas *Chlorella sp* mediante cromatografía de gases acoplado a detección de ionización de llama.

### **1.9. VARIABLE DEPENDIENTE:**

- Biodiesel de tercera generación.

### **1.10. INDICADORES**

- Poder calorífico,
- Densidad °API,
- Gravedad específica,
- Carbón residual,
- Punto de inflamación,
- Viscosidad cinemática a 40°

## 1.11. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla 2.Operacionalización de las variables

VARIABLES	TIPO	DESCRIPCIÓN	INDICADORES	UNIDADES
Potencial de producción de lípidos de la microalga <i>Chlorella sp</i>	INDEPENDIENTE	Se utiliza el extractor Soxhlet para mezclar la biomasa con el disolvente y de esta forma obtener los lípidos inmersos en la muestra.	Determinación de lípidos	ml
		Este método de análisis permite determinar la presencia y cantidad de ácidos grasos totales en el aceite microalgal.	Análisis del aceite de microalgas <i>Chlorella sp</i> mediante cromatografía de gases acoplado a detección de ionización de llama (CG-FID).	%
Biodiesel de tercera generación	DEPENDIENTE	Estos métodos de análisis establecen las propiedades físicas-químicas del hidrocarburo obtenido compuesto por metil ésteres (biodiesel).	Poder calorífico	Cal/g
			Densidad °API,	°API
			Gravedad específica	---
			Carbón residual	%(P)
			Punto de inflamación,	°C
			Viscosidad cinemática a 40° C	Cst

Fuente: (Terán-Posada,2018).

## 2. CAPITULO II

### 2.1. MARCO DE REFERENCIA

#### 2.1.1. MARCO TEÓRICO

##### Microalgas

Son microorganismos que logran desarrollarse en diversos tipos de aguas ya sean dulces o saladas, sin importar que las mismas presenten diversas composiciones. El cultivo y crecimiento de microalgas no provoca deforestación ni cambios negativos al medio ambiente, ya que para el crecimiento de estos microorganismos no necesitan de la utilización de grandes espacios de tierras. Diversos estudios mencionan que existen muchísimos tipos de estas microalgas, de las que 30 000 han sido objeto de diversos estudios. El ciclo de crecimiento de las microalgas es rápido, ya que son microorganismos autótrofos y realizan el proceso de la fotosíntesis, obteniendo finalmente energía química (Nuñez Castellanos, 2017).

Por consiguiente, existen especies que se adaptan mejor a condiciones de crecimientos específicas y locales, mientras que con otras fuentes de materias primas para realizar biodiesel no existe esta posibilidad. La productividad en correlación con el espacio físico que se utiliza para generar el biodiesel es 40 a 132 veces inferior que con otras fuentes convencionales que se utilizan para hacer biocombustibles, la biomasa de las microalgas producen tres componentes esenciales como son los carbohidratos, las proteínas y los lípidos, cabe mencionar que estos lípidos se producen en mayor cantidad que los lípidos que tienen las plantas terrestres y debido a esta razón forman una buena fuente para la obtención de biodiesel (Nuñez Castellanos, 2017).

Además, estos lípidos contienen el doble de la energía que se concentra en los carbohidratos, lo que con lleva a un aumento significativo en el poder energético del biodiesel. Debido a las condiciones donde cumplen sus etapas de vida las microalgas, varia la acumulación del contenido lipídico de las mismas. Una de las microalgas que alcanzan cerca del 75 % de aceite es la *Botryoccus braunii*.

Las microalgas del género *Chlorella* alcanzan cantidades de aceites entre 10-60% (Nuñez Castellanos, 2017).

### **Chlorella Sp.**

*Chlorella sp.*, es una microalga de color verde que tiene una forma elipsoidal, la misma que crece como células simples. Estas células corresponden a las de tipo *Chlorophyta* y la variedad de *Chlorophyceae*. Estos microorganismos se han utilizado en cultivos con propósitos alimenticios y producción de metabolitos. Este tipo de microalga ha sido aplicado a tratamientos de aguas residuales siendo efectiva en la remoción de nitrógeno, fósforo, demanda química de oxígeno y metales. Para la producción de lípidos de esta cepa se sugiere la disminución del nitrógeno ureico en la alimentación de la microalga ya que de esta manera se logra un aumento en el peso seco celular, debido a la acumulación de lípidos (Infante et al., 2012).



Ilustración 1. Célula de *Chlorella Sp.*  
Fuente: (Martínez Tristán, 2012)

Este tipo de células presentan estructuras celulares como: membrana celular núcleo, clorofila y demás pigmentos en los cloroplastos similares a los encontrados en las plantas, este microorganismo mientras tenga la acción directa de la luz solar, dióxido de carbono obtenido del agua, nutrientes minerales y biológicos, tiende a multiplicarse perennemente debido al proceso de separación celular en el cual una célula se divide en una proporción 1:4, hasta obtener una proliferación general. Gracias a este proceso de división celular, el alga *Chlorella* consigue ser sembrada en grandes cultivos. Dentro de las características el tamaño promedio de estas células del género *Chlorella* es de 2-8  $\mu\text{m}$ , por tanto, se asemeja a las dimensiones de las células humanas (Martínez Tristán, 2012).

Las especies *Nannochloropsis salina* y *Dunaliella salina* son las microalgas más competentes para la obtención de grandes cantidades de ácidos grasos según manifiesta un instituto de investigaciones en energías de tipo solar abreviado SERI en inglés. De manera similar, en Estados Unidos un laboratorio de energías abreviado NREL en inglés nombra a las especies *Scenedesmus*, *Dunaliella*, y *Chlorella* como las más utilizadas y con gran éxito para generar biodiesel. La tabla # 3 muestra el porcentaje de los lípidos contenidos de ciertas microalgas, también las diferencias que existen entre cada especie y género de agua dulce y marina (Arias Peñaranda et al., 2013).

Tabla 3. Contenido Lipídico algunas microalgas.

<b>AGUA DULCE/ MARINA</b>	<b>MICROALGA</b>	<b>LÍPIDOS</b>
Agua dulce	<i>Chlorella emersonii</i>	63
	<i>Chlorella protothecoides</i>	11-59
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	27
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	13-23
	<i>Chlorella saccharophila</i>	18-54
	<i>Chlorella sp.</i>	19-43
	<i>Chlorella vulgaris</i>	15-58
	<i>Chlorella zofingiensis</i>	51
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	35
	<i>Neochloris oleoabundans</i>	26-38
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	31
	<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	8-12
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-43
	<i>Scenedesmus rubescens</i>	27-43
<i>Scenedesmus sp.</i>	7-53	
Marina	<i>Chlorella minutissima</i>	57
	<i>Chlorella sp.</i>	35-52
	<i>Chlorella vulgaris</i>	57

AGUA DULCE/ MARINA	MICROALGA	LÍPIDOS
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	24
	<i>Nannochloris sp.</i>	40
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	8-54
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	24-60
	<i>Tetraselmis suecica</i>	20-54

Fuente: (Arias Peñaranda et al., 2013)

## **Fotobiorreactores**

Los fotobiorreactores son canales cubiertos en su totalidad en los que se lleva a cabo el ciclo de vida celular de las microalgas. Estos conductos son expuestos al aire libre para recibir la radiación directa emitida del sol y también pueden recibir radiación artificial, esta es una gran ventaja frente a los estanques. Los fotobiorreactores pueden ir situados también dentro de invernaderos de plástico o de cristal, para de esta manera disponer de una temperatura ambiente más elevada (Palacios, 2013).

Existen diversos tipos de fotobiorreactores como los de tipos cerrados que son tubos de plásticos o también de vidrio con una representación triangular en los cuales fluyen gases de oxígeno y dióxido de carbono en sentido contrario de las microalgas, también existen tubulares con desarrollo de forma heterotrófica en el cual las microalgas circulan horizontalmente con su medio de cultivo haciendo que de esta manera no se asienten en la base del tubo y no necesite de luz sino bastante glucosa. Asimismo se presentan los fotobiorreactores mixotróficos en forma de columna dispuesto verticalmente con burbujas en el cual se suministra en la columna dióxido de carbono e iluminación con ayuda de tubos que se encuentran por dentro del fotobiorreactor, este tipo de fotobiorreactor se prioriza realizar la fotosíntesis (Nuñez Castellanos, 2017).

## Transesterificación

El proceso llamado transesterificación es la reacción de tipo reversible que ocurre entre triglicéridos con un alcohol para obtener biodiesel, el mismo que está compuesto por moléculas de alquil-éster, también se genera glicerol como subproducto de esta reacción, usualmente en este proceso se utilizan alcoholes de bajo peso molecular como son: metanol y etanol. Para acelerar la reacción se usa un catalizador que puede ser una base (KOH o NaOH) o un ácido. (Fernández-Linares, Montiel-Montoya, Millán-Oropeza, & Badillo-Corona, 2012).

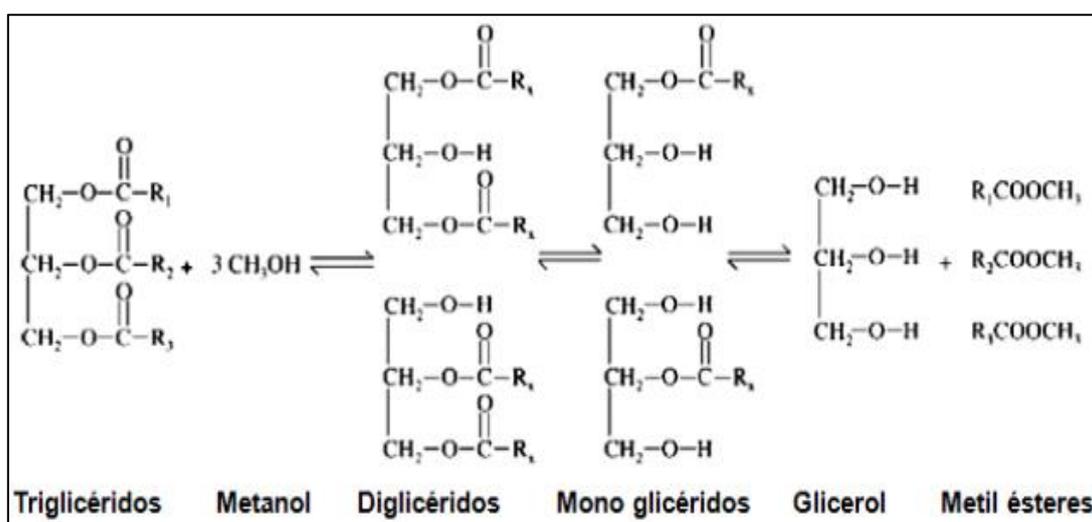


Ilustración 2. Reacción general de transesterificación

Fuente: (Fernández-Linares et al., 2012)

## Biodiesel

El biodiesel es un compuesto que se utiliza como combustible líquido hecho de alquil-ésteres de cadena corta, resultado de la reacción entre triglicéridos con alcoholes comúnmente como metanol. La biomasa que se utiliza para obtener los triglicéridos es renovable y no perjudicial con el medio ambiente. Entre las biomásas renovables para obtener biodiesel se encuentran: aceites de diversas plantas, microalgas y grasas de origen animal. Se han empleado diversas metodologías para obtener biodiesel como son: uso directo de aceites o mezclas de éstos con diésel fósil, microemulsiones, pirólisis y transesterificación. De estas cuatro técnicas la transesterificación es la más factible al problema de altas viscosidades (Fernández-Linares et al., 2012).

## 2.1.2. MARCO CONCEPTUAL

**CONTAMINACIÓN AMBIENTAL:** es el resultado procedente de las actividades que ha generado la humanidad, creando agentes físicos o químicos que dañan el medio ambiente y producen el llamado efecto invernadero, el mismo que es el resultado de la acumulación de los gases nocivos que se almacenan en el aire como el dióxido de carbono, azufre, entre otros. Estos gases se producen por la combustión de combustibles fósiles convencionales (Bermeo Castillo, 2011).

**COMBUSTIBLES FÓSILES:** son los provenientes de yacimientos de petróleo, resultado de una serie de procesos químicos que se realiza al crudo de petróleo extraído del suelo. Estas fuentes de energía tiene una amplia demanda mundial desde su descubrimiento, por tanto existe la posibilidad del agotamiento del mismo, además de que el consumo de estos combustibles generan cambios climáticos (Montero-Sánchez et al., 2012).

**MICROALGAS:** estas células poseen una inmensa capacidad para reducir el cambio climático y efecto invernadero ya que se las puede utilizar en tratamientos de aguas captando diversos componentes, también en las industrias pueden captar el dióxido de carbono que emana estas fábricas, además debido a su alto contenido de lípidos es favorable para convertirlo en biodiesel de tercera generación (Nuñez Castellanos, 2017).

**BIOMASA:** se entiende como biomasa a la cantidad de materia orgánica de origen vegetal u animal, la biomasa proveniente de microalgas posee altas cantidades de vitaminas, proteínas y lípidos que son una opción viable a problemas medioambientales, además su proceso de fotosíntesis ayuda al aumento de oxígeno en el planeta y la generación de biodiesel a través de su contenido lipídico (Nuñez Castellanos, 2017).

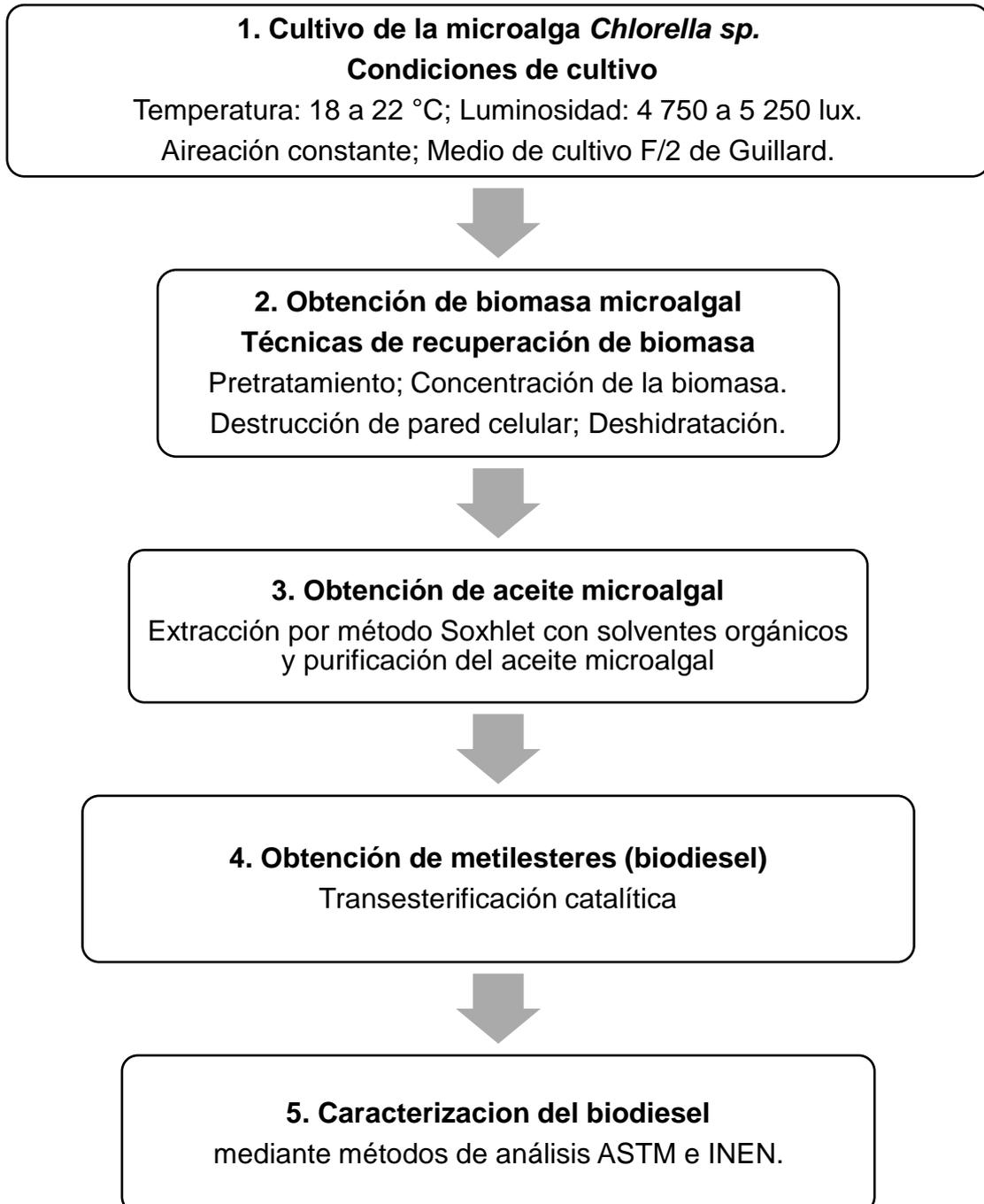
**BIODIESEL:** este combustible está compuesto por una mezcla de metil-ésteres de ácidos grasos de carbono 14 al 22, resultado de la transesterificación del aceite microalgal. Este biodiesel puede ser usado puro (al 100%) o mezclado

con diésel comercial en diferentes proporciones para sus diversas aplicaciones (Arias Peñaranda et al., 2013).

### 2.1.3. MARCO CONTEXTUAL

A continuación, se presenta un diagrama que explica los pasos para realizar la experimentación de este proyecto.

Diagrama de elaboración de biodiesel proveniente de la microalga *Chlorella sp.*



Fuente: (Terán-Posada,2018).

### **2.1.3.1. Delimitación espacial**

El trabajo de titulación se realizará en los laboratorios que se encuentran en la Facultad de Ingeniería Química de nuestra Universidad.

### **2.1.3.2. Delimitación temporal**

La presente tesis se desarrollará en el periodo de cuatro meses aproximadamente, en el ciclo II 2018 – 2019.

### **2.1.3.3. Delimitación del contenido**

El trabajo de titulación estará comprendido en cuatro fases, como primera fase, en el desarrollo del cultivo en sistema estático de la microalga *Chlorella sp*, en la segunda fase se basa en la cosecha de la biomasa, la tercera en la extracción del aceite de la microalga, para finalizar la parte experimental en la cuarta fase, en la transesterificación catalítica para la obtención de biodiesel.

### **2.1.3.4. Campo**

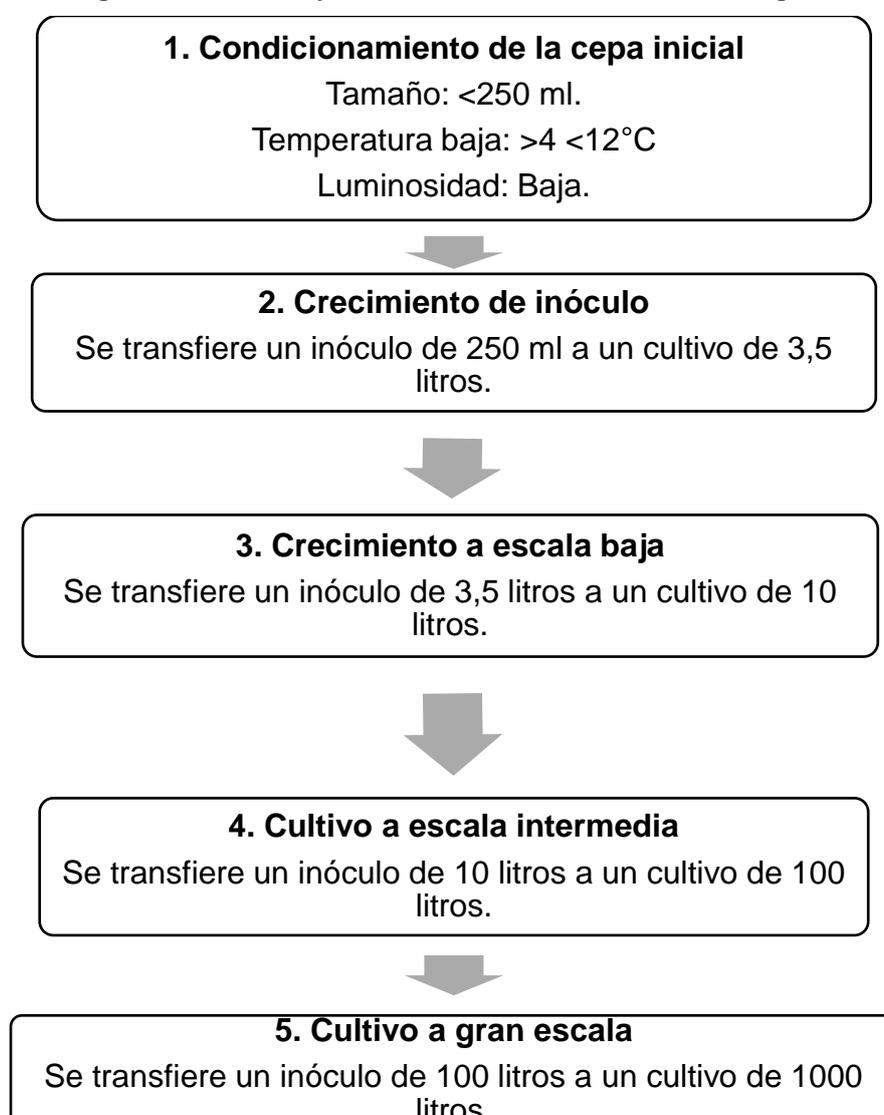
Ingeniería Química (Ingeniería y Tecnologías Químicas).

### 3. CAPITULO III

#### 3.1. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Este trabajo de investigación presenta una metodología cuantitativa y del tipo experimental debido a que se realiza una manipulación de la variable independiente sobre la variable dependiente, también es prospectiva ya que se desarrolla en cuatro fases en base a una planificación, de igual manera es correlacional porque se comparan los datos que se toman al inicio y final de la experimentación. Este trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de nuestra facultad y la parte experimental quedó establecida en cuatro fases, que son:

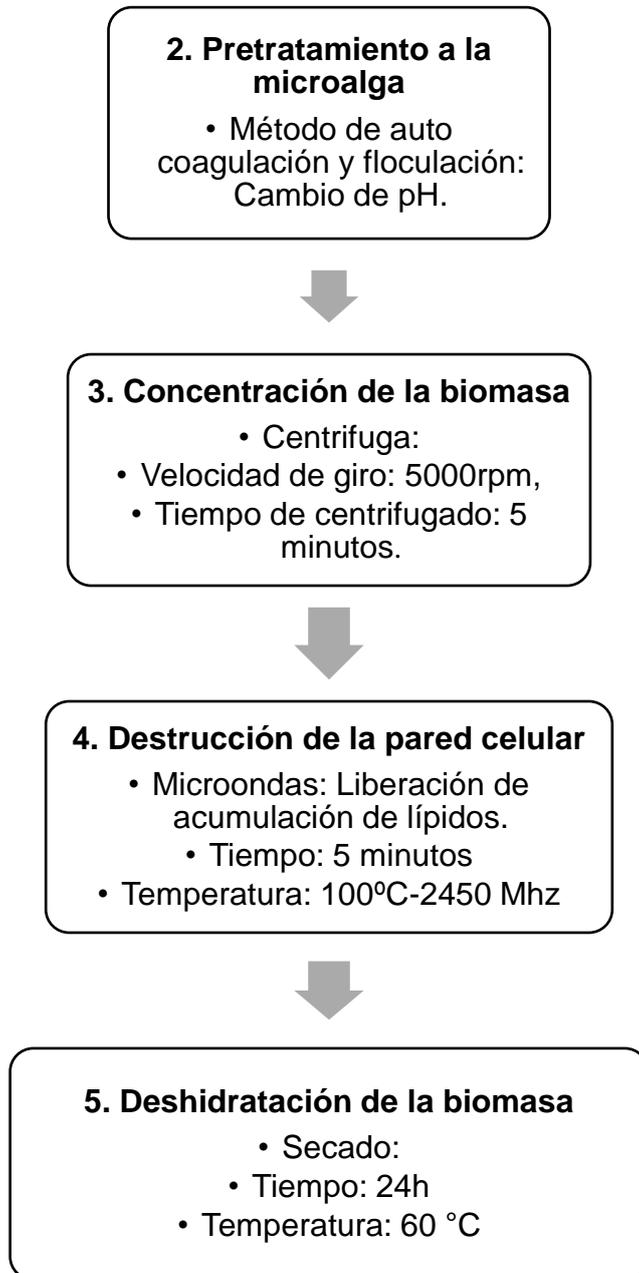
Fase 1. – Diagrama de cultivo y escalamiento celular de la microalga *Chlorella sp.*



Fuente: (Terán-Posada,2018).

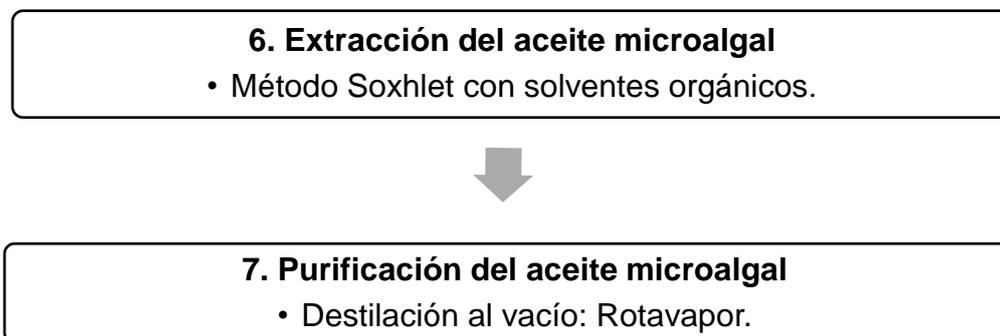
Para lograr un excelente cultivo se debe tener en consideración varios requerimientos, realizando el monitoreo y evaluación de los parámetros como pH, luminosidad, salinidad, temperatura, concentración de nutrientes, estableciendo la dosis correspondiente, esta etapa tiene la finalidad de alcanzar la máxima productividad del desarrollo de las microalgas y la producción de lípidos, para obtener una cantidad masiva de biomasa de microalga.

**Fase 2. – Diagrama de recolección de biomasa**



Fuente: (Terán&Posada,2018).

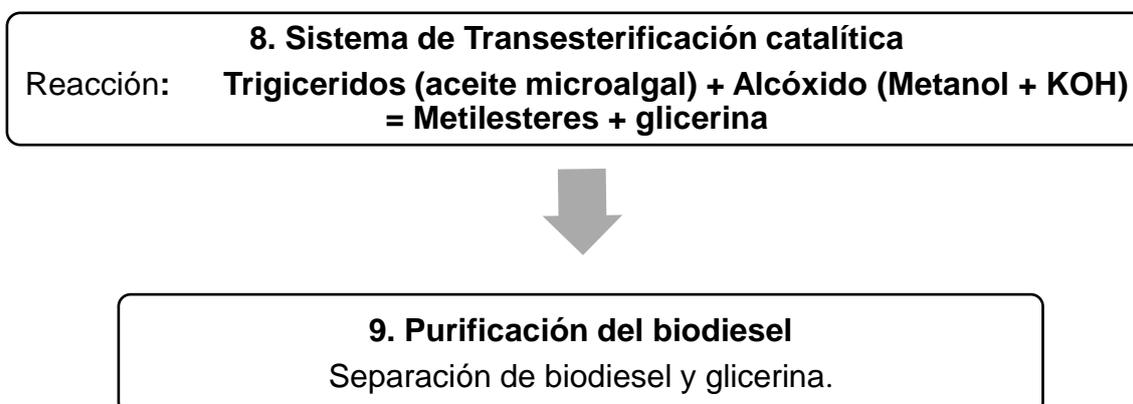
**Fase 3.- Diagrama de extracción de aceite natural sintetizado por la microalga *Chlorella* sp**



Fuente: (Terán&Posada,2018).

Tercera fase, consiste en obtener el aceite presente en las microalgas de tal manera se empleó el método de Soxhlet, conocido como lixiviación o extracción sólido-líquido, que consiste en la extracción de muestras sólidas, basado en la separación de componentes en combinación con solventes orgánicos, el más apropiado es el hexano, debido a sus particulares propiedades físicas como solvente y bajo costo. Una vez alcanzado el aceite sintetizado de microalga, es necesario purificar el mismo, realizando una destilación simple o para mayor eficiencia destilación al vacío, esto se lo realiza con el diseño de aislar el aceite y el solvente orgánico utilizado, para el análisis FAME´s por cromatografía de gases acoplado a detección de ionización de llama (CG-FID).

**Fase 4. – Diagrama de transesterificación catalítica para la producción de biodiesel.**



Fuente: (Terán&Posada,2018).

Cuarta fase, para la generación del biodiesel se lo llevó a cabo mediante el proceso de transesterificación catalítica. El sistema de reacción propuesto se tomó de investigaciones de producción de biodiesel, en la cual, utilizan la transesterificación catalítica que consiste en construir un sistema, en el que se utiliza un balón comúnmente llamado de tres bocas al que se le adiciona un condensador para la recepción de los gases, una plancha de calentamiento que proporciona agitación magnética y un termómetro, esta fase tendrá una duración de una hora, luego se procede a dejar en reposo en un embudo de decantación para la separación de fases del biodiesel y glicerina, para consiguiente la caracterización del biodiesel.

## **3.2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS**

### **3.2.1. Materiales**

- Termómetro de vidrio de 0-100°C.
- Espátula de metal pequeña de hoja angosta.
- Cápsula de porcelana de 100ml.
- Balón de tres bocas de pirex de 50ml.
- Fiolas de pirex y de vidrio de 50,100,150 y 200ml.
- Vidrio reloj con un diámetro de 100mm.
- Matraz Erlenmeyer de vidrio de 50,100,150ml.
- Lámparas fluorescentes LED marca Philix de 40 watts.
- Embudo de decantación de vidrio de 100ml.

- Papel filtro estándar.
- Mangueras de ½ pulgada de caucho.
- Papel de aluminio.
- Pipeta Pasteur de plástico de 1ml.
- Cámara Neubauer marca BOECO de 0-100mm.
- Cubre objetos de vidrios de 25 x75 mm.
- Vasos de precipitación de vidrio de 50,100,150,200,1000ml.
- Micropipetas de 0-100 µl.
- Probetas de vidrio de 10,50,100,150ml.
- Tubos de ensayo de vidrio de 10ml.
- Soporte Universal de metal.

### **3.2.2. Reactivos**

- 3,5 litros de inóculo de microalgas *Chlorella sp*, concentración celular 300.000 (cel/ml).
- Medio de cultivo Guillar F/2: Nutrientes mayores, Metales, Vitaminas.
- Clorox (hipoclorito de sodio comercial al 5.25%).
- Tiosulfato de Sodio.

- O-Tolidine.
- Solvente orgánico: Hexano al 98%.
- Metanol al 98%.
- KOH al 98%.

### **3.2.3. Equipos**

- Cromatógrafo de gases: marca H.P. 5890A Series II con inyector Split/splitless a 250°C con relación Split 1:40 y detector de ionización de llama FID.
- Extractor Soxhlet de vidrio de 250 ml.
- Microscopio bifocal marca Leica CME.
- Rotavapor marca Heidolph.
- Balanza analítica marca sartorius de 0,1 mg a 100 mg.
- Centrifuga marca Hettich universal de hasta 5000 rpm.
- Bombas de aireación marca JAC modelo sp 2500.
- Estufa eléctrica de hasta 150°C.
- Plancha de calentamiento con agitador magnético modelo ms300Hs de hasta 380°C y 1500 rpm.

### **3.3. PROCEDIMIENTO**

El trabajo de investigación está conformado por cuatro fases, las que se describe a continuación:

#### **FASE 1**

##### **1. Pretratamiento del agua**

Para alcanzar óptimos escenarios en las que estas células crezcan, sin compuestos o agentes que contaminen el medio en el que viven, además de eliminar el cloro residual procedente del agua. Se realizó el siguiente método de esterilización.

##### **1.1. Esterilización Química**

Según (Torretera & J. Tacón, 1989) se utilizó 416 mililitros de hipoclorito de sodio al 6% aforado en un litro permaneciéndolo en la oscuridad, por tanto de esta solución se adiciona 0.25 ml por cada 1000 ml de agua, luego se deje descansar por 12 horas esta disolución. Posteriormente y se agrega 0.1 ml de Tiosulfato aforado en 1 litro al agua del cultivo, después de 5 minutos se incorpora aireación al estante y se deja de esta manera por una hora. A la culminación de la hora se adiciona el alimento de estas células anticipadamente desinfectados.

En el tratamiento de los recipientes para el cultivo, se emplearon tanques rectangulares, material de fibra de vidrio, con diferentes capacidades de 10 litros, 200 litros, 500 litros, además esterilizando el agua marina con la que se llevará a cabo los cultivos.

Este procedimiento se realizó cuando el inóculo de 10 litros se llevó a escala de 100 litros.

- Se agrega: **15ml cloro en 100 litros  $H_2O$** , se deja reposar por 12 horas, luego se añade **15ml Tiosulfato de Sodio**, una vez esterilizado el recipiente y el agua esté libre de cualquier contaminante se añade **25ml Medio de Cultivo Guillard F/2**.

Luego el cultivo de 100 litros, llevarlo a un cultivo de 500 litros, debemos agregar las dosis:

- Se agrega: **60ml cloro en 500 litros  $H_2O$** , se deja reposar por 12 horas, luego se añade **60ml Tiosulfato de Sodio**, una vez esterilizado el recipiente y el agua esté libre de cualquier contaminante se añade **100ml Medio de Cultivo Guillard F/2**.

Después de agregar tiosulfato de sodio para comprobar la presencia de cloro se agrega 3 gotas de O-Tolidine

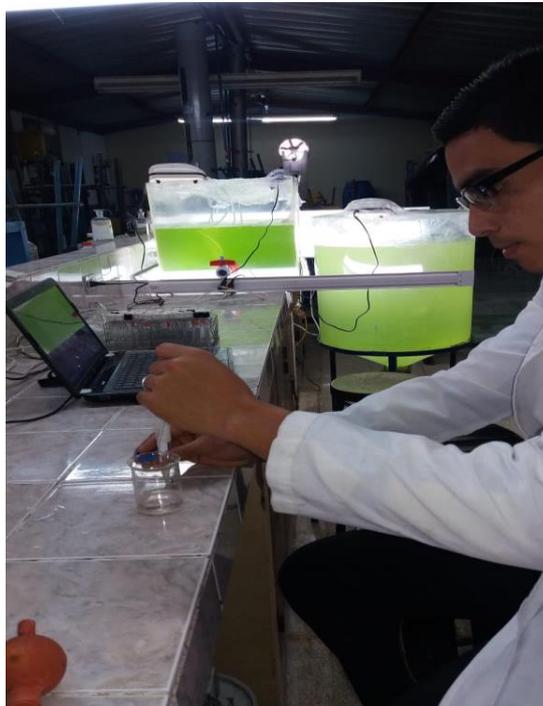


Ilustración 3. Comprobación de presencia de cloro con O-tolidine

Fuente: (Terán&Posada,2018).

## 2. Preparación de medio de cultivo GUILLAR “F/2” (ver ANEXO D)

Según (Torrentera & J. Tacón, 1989) recomienda emplear un mililitro de estos compuestos por cada litro de agua proveniente del mar, y de esta manera elaborar el fertilizante “F/2”.



Ilustración 4. Vitaminas - Nutrientes mayores - Metales.

Fuente: (Terán & Posada,2018).

## 3. Mantenimiento de microalgas *Chlorella sp.*

El proceso del cultivo de la microalga *Chlorella sp* se ejecutó en un fotobiorreactor, con los diferentes componentes necesarios para el desarrollo de estas células, se desarrolló esta experimentación en el laboratorio de aguas y medio ambiente de nuestra facultad, partiendo de un inóculo de 3,5 litros adquirido en el (CENAIM – ESPOL).

### 3.1. Diseño de fotobiorreactor

Para el desarrollo de la parte experimental, para el primer cultivo 1 botellón de plástico con capacidad de 10 litros, luego para el cultivo de 100 y 500 litros.

Se adecuó un reactor que estaba en el laboratorio de aguas de la Facultad, fotobiorreactor para el cultivo de microalga *Chlorella sp*, con las siguientes características:

- **Material:** Fibra de vidrio
  
- **Dimensiones:**
  - Para el cultivo de 100 litros (81 cm de largo, 52 cm de ancho, 50 cm de altura).  
Volumen total del recipiente =  $81\text{cm} * 52\text{cm} * 50\text{cm} = 210600 \text{ cm}^3$   
= 210.6 litros
  
  - Para el cultivo de 500 litros (100cm de largo, 100 cm de ancho, 60 cm de altura).  
Volumen total del recipiente =  $100\text{cm} * 100\text{cm} * 60\text{cm} = 600000 \text{ cm}^3$   
= 600 litros
  
- **Bombas de aireación:** Model: SP-2500; Voltage: 110V-60Hz; Power: 34W; Hmax: 2.0m; Qmax: 1400L/h; Maximum liquid temperatura 40°C, la turbulencia que genera es para evitar que las microalgas sedimenten.
  
- **Fuente de luz:** Lámparas LED: Lámparas fluorescentes de 65 a 80 W (4 750 a 5 250 lux), a una distancia de 15-20 cm, colocadas en la parte externa lo que proporcionaba un nivel de iluminación de la superficie de cultivo de 4 750 a 5 250 lux,
  
- **Nutrientes:** Medio de cultivo Guillard F/2

## 4. Proceso de cultivo de microalgas

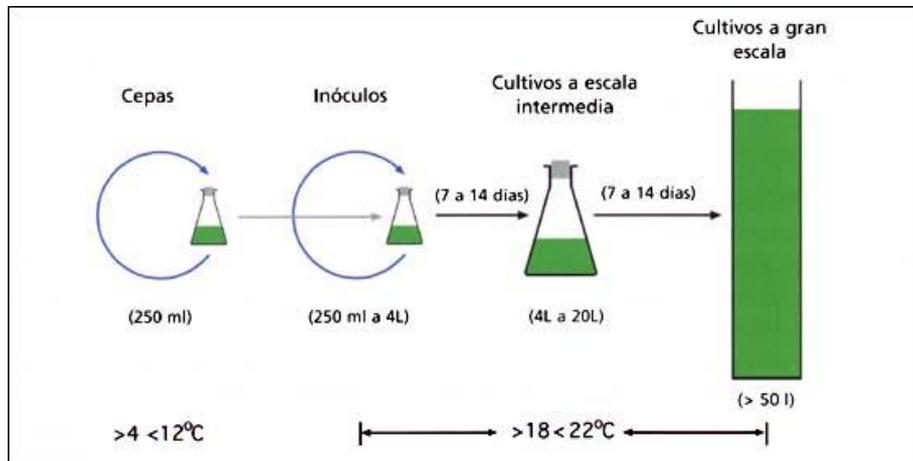


Ilustración 5. Etapas en la producción de algas.

Fuente: (Helm, Bourne, Lovatelli, Tall, & Cigarría, 2006)

### 4.1. Cultivo de baja escala a escala intermedia

Al empezar nuestro proceso, partimos con un inóculo 3,5 l en volumen, creció en un período de 8 a 10 días, controlando temperatura, luminosidad, con un flujo de aire con agitación permanente, una vez el cultivo de haber alcanzado una densidad poblacional alta se emplea el mismo para hacer que se desarrolle otro a una escala intermedia como se muestra en la ilustración 6, el cultivo realizado fue de 10 litros, se replica el ciclo ya mencionado.



Ilustración 6. Representación de inóculo de 10 litros en fase exponencial al noveno día con una concentración celular de 13.850.000 (cel/ml)

Fuente: (Terán & Posada,2018).

## 4.2. Cultivo de escala intermedia a gran escala

### Día 0 – Cultivo de 100 litros



Ilustración 7. Representación de cultivo de 100 litros en el momento de escalar con una concentración celular de 750.000 (cel/ml)

Fuente: (Terán & Posada,2018).

## Día 1 – Cultivo de 100 litros

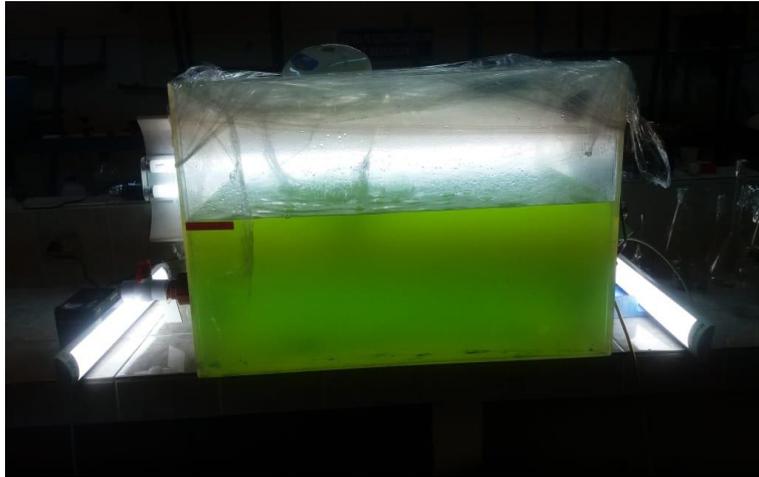


Ilustración 8. Representación de cultivo de 100 litros en el segundo día con una concentración celular de 2.900.000 (cel/ml)

Fuente: (Terán & Posada,2018).

## Día 4 – Cultivo de 100 litros con agua tratada

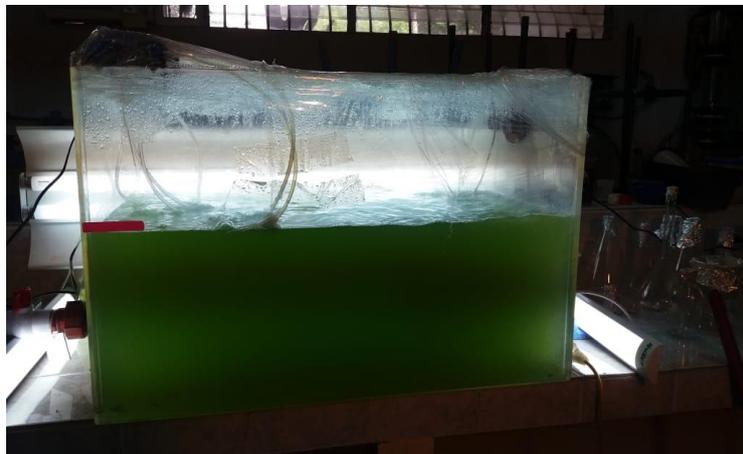


Ilustración 9. Representación de cultivo de 100 litros en el quinto día con una concentración celular de 10.250.000 (cel/ml).

Fuente: (Terán & Posada,2018).

### 4.3. Cultivo de gran escala a uno de mayor volumen

#### Día 1 – Cultivo de 500 litros



Ilustración 10 Representación de cultivo de 500 litros en el momento de escalar con una concentración celular de 1.750.000 (cel/ml)

Fuente: (Terán & Posada,2018).

#### Día 2– Cultivo de 500 litros

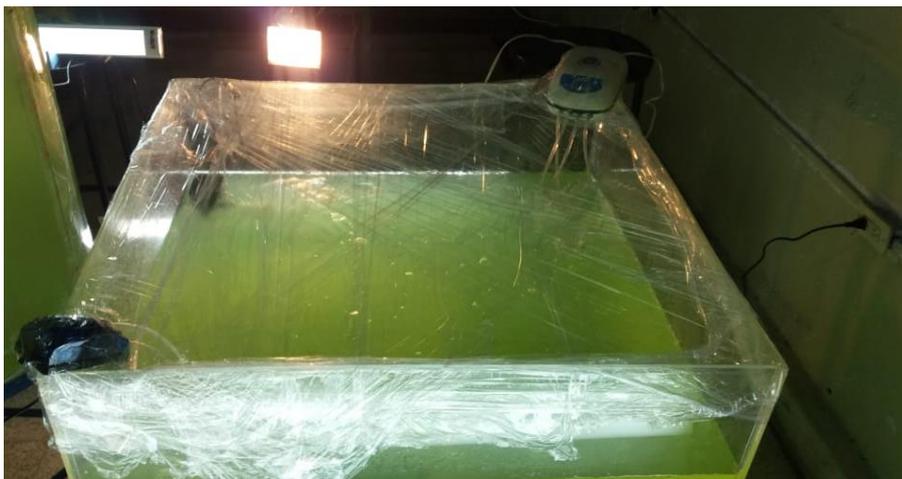


Ilustración 11 Representación de cultivo de 500 litros en el segundo día con una concentración celular de 2.900.000 (cel/ml)

Fuente: (Terán & Posada,2018).

#### Día 4 – Cultivo de 500 litros



Ilustración 12 Representación de cultivo de 500 litros en el cuarto día con una concentración celular de 8.250.000 (cel/ml)

Fuente: (Terán & Posada,2018).

#### Día 8– Cultivo de 500 litros

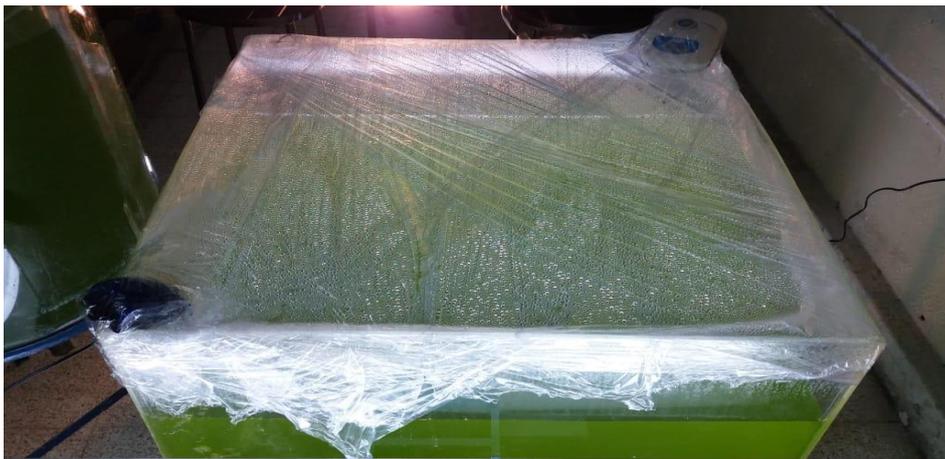


Ilustración 13 Representación de inóculo de 500 litros en fase exponencial al octavo día con una concentración celular de 14.900.000 (cel/ml).

Fuente: (Terán & Posada,2018).

## 5. Método de conteo celular

### Determinación de la densidad de población de las microalgas

Se realizó el conteo celular mediante hematocitómetro o cámara de Neubauer para observar el crecimiento celular de las microalgas, se toma 1 mililitro de muestra con una pipeta Pasteur, seguidamente se toma 20 microlitros y se coloca en la cámara que tiene adherido el cubreobjeto, procurando que la muestra cubra toda la superficie de la cámara, dejando transcurrir de 5 a 10 minutos con la finalidad que la muestra se estabilice. El conteo celular se realizó de forma en L, con un aumento de 4x para visualizar los cuadrantes de la cámara, seguido de un aumento de 10x y 40x, se toma apunte del número de células contadas en los cuadrantes A, B, C, D, E.

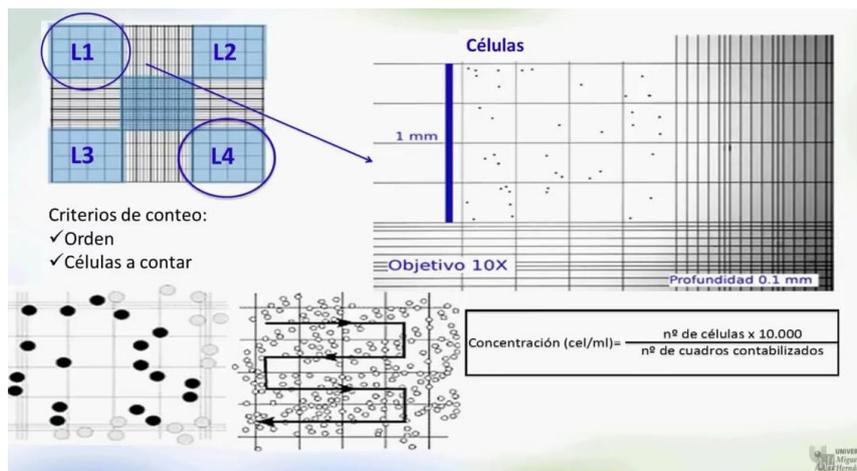


Ilustración 14 Representación de lectura en la cámara de Neubauer

Fuente: (Torretera & J. Tacón, 1989)

### Cámara de Neubauer.

Según (Cartagena Arévalo & Malo, 2017) la cámara de Neubauer consta con una cuadrícula de recuento que presenta 9 cuadrados grandes, con dimensiones de  $1 \text{ mm}^2$  cada uno. Estos cuadrados a su vez se subdividen en 16 con bordes de un tamaño de  $0,25 \text{ mm}$ . El cuadrado grande del centro está fraccionado en 25 subdivisiones medianas con bordes de  $0,2 \text{ mm}$  y a su vez sigue subdivididos en 16 cuadrados pequeños con pequeños bordes de  $0,05 \text{ mm}$  y una zona de  $0,0025 \text{ mm}^2$ . El conteo realizado en el cuadro grande del centro se utiliza para

células de pequeño tamaño como de 2-8  $\mu\text{m}$  que presenta este tipo de microalga, el resto de cuadrículas sirven para contar células más grandes. Para establecer la cantidad celular que se observa y cuenta por medio de este método se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración } \frac{\text{cel}}{\text{ml}} = \frac{\text{Número de las células} * \text{Inverso de la dilución}}{(\text{area} * \text{profundidad} * \text{volumen}) * \frac{\# \text{ cuadrantes leídos}}{25}} * \frac{\text{mm}^3}{0,001\text{ml}}$$

**Ecuación 1. Cálculo de la concentración celular (Arévalo & Malo, 2017)**

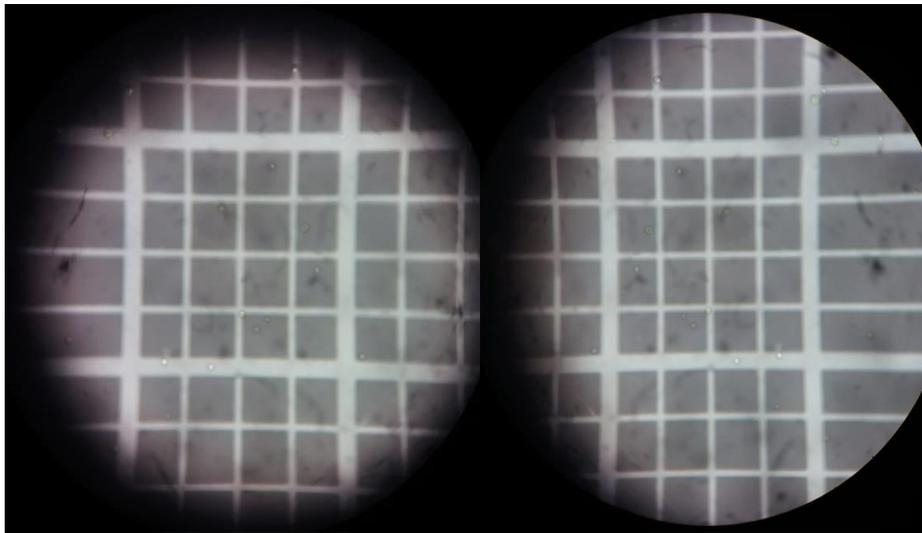


Ilustración 15. Conteo de microalgas en microscopio con aumento de 40x

Fuente: (Terán & Posada,2018).

## FASE 2

### 6. Concentración de biomasa:



Ilustración 16. Biomasa húmeda recolectada

Fuente: (Terán & Posada,2018).

### 6.1 Pretratamiento de la biomasa

#### 6.1.1. Auto-floculación

El ph del cultivo de microalgas es de 8 a 9 según reporta (Palomino, 2016), en este estudio se obtuvo un ph de 8.48, siendo adecuado para la recolección de biomasa.



Ilustración 17 Medición de pH

Fuente: (Terán & Posada,2018).

## Presencia de biomasa en el cultivo, en el fondo del recipiente



Ilustración 18 Presencia de biomasa en el cultivo

Fuente: (Terán & Posada,2018).

### 6.1.2. Floculación y sedimentación.

Para una mayor recuperación de microalgas por sedimentación, añadimos un floculante al cultivo, aglomerando las partículas, se utilizó un tipo de polielectrolito anionico. La floculación se llevó a cabo en vasos de precipitado con 50 ml de muestra, colocando gotas de polielectrolitos, dejando actuar el polielectrolito en un tiempo aproximado 6 minutos por cada muestra.



Ilustración 19. Floculación de microalgas con polielectrolito

Fuente: (Terán & Posada,2018).

## 7. Centrifugación.

Se prepararon 8 viales con 9ml de solución de cultivo en la centrifuga proveniente del laboratorio de biotecnología de nuestra facultad y se lo realizó con una velocidad de giro de 5000 rpm por 5 minutos.



Ilustración 20 Preparación de viales con muestra de microalga  
Fuente: (Terán & Posada,2018).



Ilustración 21 Representación de biomasa centrifugada  
Fuente: (Terán & Posada,2018).

## 8. Destrucción celular

Luego de la centrifugación se debe destruir la pared celular de la microalga, para la liberación de los lípidos de su sitio intracelular, se lo realizó por el choque inducido con ondas de alta frecuencia, afectando la polaridad de los elementos que forman parte de la estructura interna de la microalga. La extracción de lípidos asistida por microondas fue atacada con microondas a 100 °C y 2450 MHz, durante 5 minutos (Palomino, 2016).

## 9. Deshidratación de la biomasa:

### 9.1. Secado.

El secado se lo realizó en una estufa eléctrica, a una temperatura de 60 °C, según (Palomino, 2016) mantener la biomasa a esa temperatura conserva una alta concentración de triglicéridos, disminuyendo ligeramente el rendimiento de los lípidos.



Ilustración 22 Biomasa a 60°C en la estufa eléctrica

Fuente: (Terán & Posada,2018)

## FASE 3

## 10. Extracción del aceite

La obtención de los lípidos de estas células se realizó mediante el método de extracción Soxhlet, empleando como solvente orgánico el n-hexano.

## Procedimiento: Aceite

- 1) Se pesa 50 gramos de biomasa microalgal.



Ilustración 23 Medición de biomasa seca

Fuente: (Terán & Posada,2018)

- 2) Se prepara el Soxhlet.
- 3) Se añade 50 gramos de biomasa en el Soxhlet.
- 4) Se añade el solvente orgánico: 250 ml de Hexano.



Ilustración 24. Soxhlet

Fuente: (Terán & Posada,2018)

- 5) Empieza la extracción de lípidos de la biomasa microalgal.

- 6) Se da por finalizada la extracción al apreciar que en el reflujo ya no hay cambio de color.



Ilustración 25. Extracción lipídica de microalga  
Fuente: (Terán & Posada,2018)

## 11. Purificación del aceite

### 11.1 Destilación

Para la purificación del aceite se realiza por destilación simple o al vacío, en este caso lo realizamos por destilación al vacío con el rotavapor, con el fin de recuperar el solvente y el aceite esté libre de otros componentes.

- 1) Se pone en calentamiento el H<sub>2</sub>O o aceite.
- 2) Se coloca el balón con la mezcla en el rotavapor.
- 3) Se produce la vaporización y condensación del solvente utilizado.
- 4) Se deja reposar el aceite



Ilustración 26. Procedimiento de separación de líquidos en el Rotavapor

Fuente: (Terán & Posada,2018)

## 12. Caracterización del aceite microalga

### Análisis Cromatografía de gases acoplado a detección de ionización de llama (GC– FID)

Para la caracterización del perfil de ácidos grasos FAMEs del aceite microalga, se realizó por el método AOCS Ce 1B-89, utilizando un cromatógrafo de gases (GC-FID), este método está diseñado para analizar la cantidad y el porcentaje de ácidos grasos que contienen los aceites.

#### FASE 4

##### 1. Transesterificación catalítica.

Consiste en un sistema conformado con un balón de tres bocas, al mismo que se le acopla un condensador para la recepción de los vapores, plancha de calentamiento con agitación magnética y con un sensor de temperatura, un recipiente de almacenamiento del alcóxido.

- 1) Se pesa 23 gramos de aceite de microalgal, 4,69 gramos de metanol, y 0,23 gramos de KOH.



Ilustración 27. Medición de gramos de aceite y reactivos.

Fuente: (Terán & Posada,2018)



Ilustración 28 Aceite microalga - Metanol - KOH

Fuente: (Terán & Posada,2018)

- 2) Se coloca el aceite microalgal en un matraz Erlenmeyer, calentándolo en una plancha de calentamiento a una temperatura de 110°C por una hora, con la finalidad de eliminar el H<sub>2</sub>O que esté presente.
- 3) Se mezcla el alcohol (metanol) con el catalizador (KOH), para que la mezcla sea homogénea se le aplica agitación constante.



Ilustración 29 Preparación del sistema para transesterificación catalítica

Fuente: (Terán & Posada,2018)

- 4) Una vez que el aceite ha alcanzado una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , se mezcla el alcóxido (metanol + KOH) con el aceite microalgal, se le agrega lentamente en una plancha de calentamiento con agitación magnética.



Ilustración 30. Obtención de biodiesel

Fuente: (Terán & Posada,2018).

- 5) Se produce una reacción exotérmica.
- 6) Se realizó este proceso durante una hora, a una temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  hasta  $65^{\circ}\text{C}$ , con 1100 rpm, tiempo que toma alcanzar la conversión más significativa.

- 7) Finalizada la reacción, se deja reposar la mezcla reaccionante (metilesteres + glicerina) en un embudo de decantación, para separar los subproductos.



Ilustración 31. Metilesteres y glicerina  
Fuente: (Terán & Posada,2018)

- 8) Se retira la glicerina siendo un subproducto de la transesterificación.  
9) La parte superior, siendo metilesteres, se somete a evaporación, para eliminar componentes que no reaccionaron.



Ilustración 32. Purificación de metilesteres  
Fuente: (Terán & Posada,2018)

### 13. Determinación de tasa de aumento de biomasa de las microalgas por día



Ilustración 33 Biomasa Microalga

Fuente: (Terán & Posada,2018)

El incremento de la densidad celular por día basado en peso húmedo se la recolectó en el día 8, siendo la fase exponencial del cultivo, se la procedió a centrifugar con todo el cultivo para luego colocarlo en una estufa eléctrica a 60°C, debido a que a esa temperatura se conserva una elevada concentración de triglicéridos.

Para calcular la cantidad de biomasa en peso seco se utilizó la ecuación de Krebs (1985) como se utilizó en la obra de (Sacristán-De Alva, Luna-Pabello, Cadena-Martínez, & Alva-Martinez, 2014):

$$r = (\ln N_t - \ln N_0)/t$$

**Ecuación 2. Ecuación de Krebs (1985) (Sacristán-De Alva et al., 2014)**

**Donde:**

r = Tasa de aumento de biomasa por día

ln = logaritmo natural

$N_0$  = densidad poblacional inicial

$N_t$  = densidad poblacional después del tiempo t (días).

**(VER CÁLCULOS ANEXO C.1)**

## SEGUIMIENTO DE CRECIMIENTO DE BIOMASA

Según (Aguilar et al., 2011) para el seguimiento de crecimiento de biomasa, se determinaron los valores de productividad (g biomasa bs/ g\*día), utilizando la siguiente ecuación:

$$K = \frac{1}{C_b} * \left( \frac{\Delta C_b}{\Delta t} \right)$$

**Ecuación 3. Productividad de biomasa (Aguilar et al., 2011)**

**Dónde:**

K= Tasa de crecimiento.

C<sub>b</sub>= Concentración celular final.

ΔC<sub>b</sub>= Variación concentración celular (Concentración final - concentración inicial).

Δt= Variación tiempo (Tiempo final - tiempo inicial).

**(VER CÁLCULOS ANEXO C.2)**

## 14. Caracterización del biodiesel

La caracterización del biodiesel se hizo en base a los requisitos señalados por la NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1489:99 y en los parámetros más significativos de un hidrocarburo: poder calorífico, Densidad °API, gravedad específica, carbón residual, punto de inflamación, viscosidad cinemática.

## 4. CAPITULO IV

### 4.1. RESULTADOS

#### Evaluación de biomasa

#### Crecimiento de microalga *Chlorella sp*

Se realizó el conteo celular a los cultivos de 10, 100 y 500 litros, para control del crecimiento celular mediante la técnica de la cámara de Neubauer, los conteos se muestran en las tablas 4,5 y 6, donde la columna de números corresponde a las células contadas a través del microscopio en el Laboratorio de Microbiología de nuestra facultad.

Tabla 4 Cultivo de 10 litros

<b>CONTEO CELULAR DEL CULTIVO DE 10 LITROS</b>		
<b>Tiempo (días)</b>	<b>Concentración celular (cel/ml)</b>	<b>Número de células</b>
1	300.000	6
2	1.200.000	24
3	2.150.000	43
4	4.650.000	93
5	9.350.000	187
6	12.750.000	255
7	13.300.000	266
8	13.550.000	271
9	13.850.000	277
10	12.900.000	258

Fuente: (Terán & Posada,2018)

Tabla 5 Cultivo de 100 litros

<b>CONTEO CELULAR DEL CULTIVO DE 100 LITROS</b>		
<b>Tiempo (días)</b>	<b>Concentración celular (cel/ml)</b>	<b>Número de células</b>
1	750.000	15
2	2.200.000	44
3	4.250.000	85
4	7.900.000	158
5	10.250.000	205
6	12.200.000	244
7	13.400.000	268
8	13.750.000	275
9	14.050.000	281
10	12.400.000	248

Fuente: (Terán & Posada,2018)

Tabla 6 Cultivo de 500 litros

<b>CONTEO CELULAR DEL CULTIVO DE 500 LITROS</b>		
<b>Tiempo (días)</b>	<b>Concentración celular (cel/ml)</b>	<b>Número de células</b>
1	1.750.000	35
2	2.900.000	58
3	4.700.000	94
4	8.250.000	165
5	11.500.000	230
6	13.850.000	277
7	14.300.000	286
8	14.900.000	298

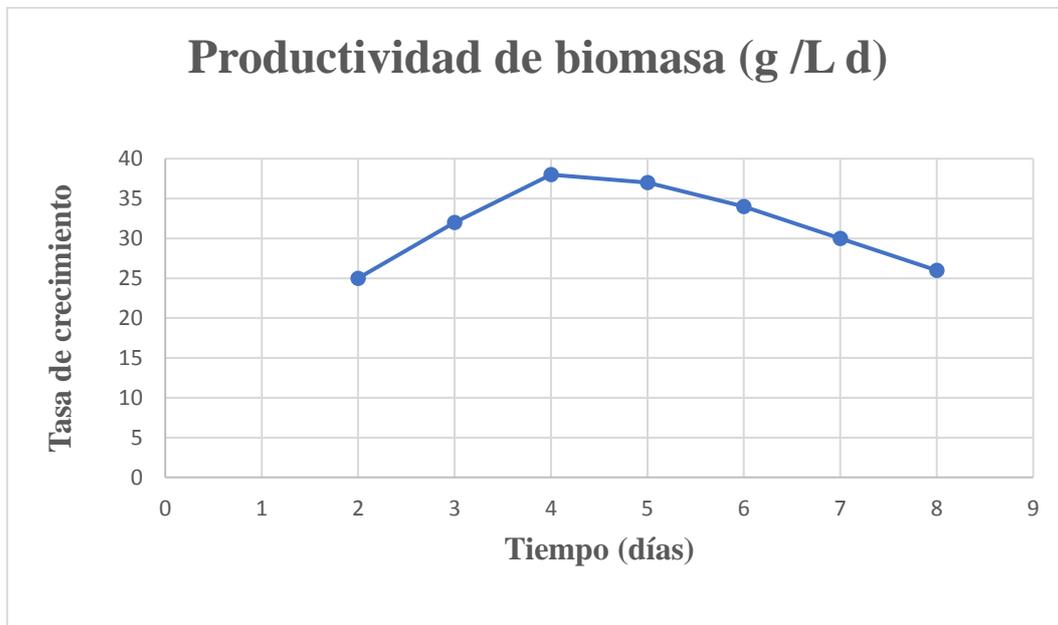
Fuente: (Terán & Posada,2018)

## Productividad de biomasa del día 1 hasta su fase exponencial en el día 10:

Tabla 7. Tasa específica de crecimiento de biomasa en la fase del cultivo.

Tiempo (días)	Tasa de crecimiento de biomasa $\times 10^{-1}$
2	25
3	32
4	38
5	37
6	34
7	30
8	26

Fuente: (Terán-Posada,2018)



Gráfica 1. Tasa específica de crecimiento

Fuente: (Terán-Posada,2018)

En la tabla # 7 se muestra la tasa específica de crecimiento de biomasa en los días del cultivo del cultivo de 500 litros y en la gráfica 1 se observa el día de la mayor tasa de crecimiento. **(VER CÁLCULOS ANEXO C.1)**

En el octavo día de cultivo se muestra una tasa de 0.26 y se obtiene una productividad volumétrica de biomasa de 0.126 (g bs/ g \* día). **(VER CÁLCULOS ANEXO C)**

**Perfil de los metil-esteres de los ácidos grasos (saturados e insaturados) de aceite de *Chlorella sp* (% total de FAMES/LT), (mg/g).**

En la extracción de los lípidos realizada en el Soxhlet, con una carga 400 gramos de biomasa seca 1 litro utilizando como solvente orgánico al hexano se obtuvo 48 ml de aceite microalgal.

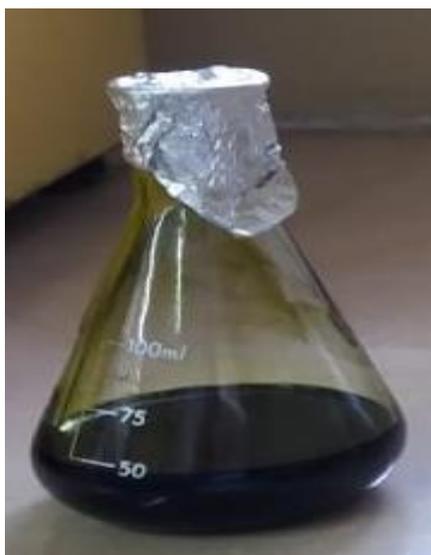


Ilustración 34 Aceite microalgal

Fuente: (Terán & Posada,2018)

La cantidad y tipos de ácidos grasos del aceite obtenido se muestran en el resultado del análisis FAMES y en la tabla # 8. **(VER ANEXO A)**

Tabla 8 Ácidos grasos saturados e insaturados obtenidos del ensayo en laboratorios U.B.A.

<b>Formula molecular FAMES</b>	<b>Nombre Ácidos grasos</b>	<b>% FAMES/LT</b>	<b>mg/g</b>
C10:0	Ácido Caprico	ND	ND
C12:0	Ácido Láurico	5,76	4,34
C13:0	Ácido Tridecanoico	ND	ND
C14:0	Ácido Mirístico	3,11	2,34
C15:0	Ácido Pentadecanoico	ND	ND
C16:0	Ácido Palmítico	10,06	7,57
C16:1	Ácido Palmitoleico	11,37	8,56
C17:0	Ácido Heptadecanoico	15,25	11,48
C18:0	Ácido Estearico	4,50	3,39
C18:1n9c	Ácido Oleico	11,39	8,58
C18:2n6c	Ácido Linoleico	25,10	18,90
C12:2n6	Ácido g-Linoleico	N.D.	N.D.
C18:3n3	Ácido Linolénico	7,59	5,71
C20:0	Ácido Araquídico	ND	ND
C20:1n9	Ácido Eicosenoico	ND	ND
C20:3n6	Ácido Eicosapentaenoico	0,75	0,57
C20:4n6	Ácido Araquidónico	N.D.	N.D.
C22:0	Ácido Behenico	N.D.	N.D.

Fuente: (Terán & Posada,2018)

## Obtención de biodiesel



Ilustración 35 Biodiesel a partir de microalgas

Fuente: (Terán-Posada,2018)

## Análisis realizados a biodiesel obtenido

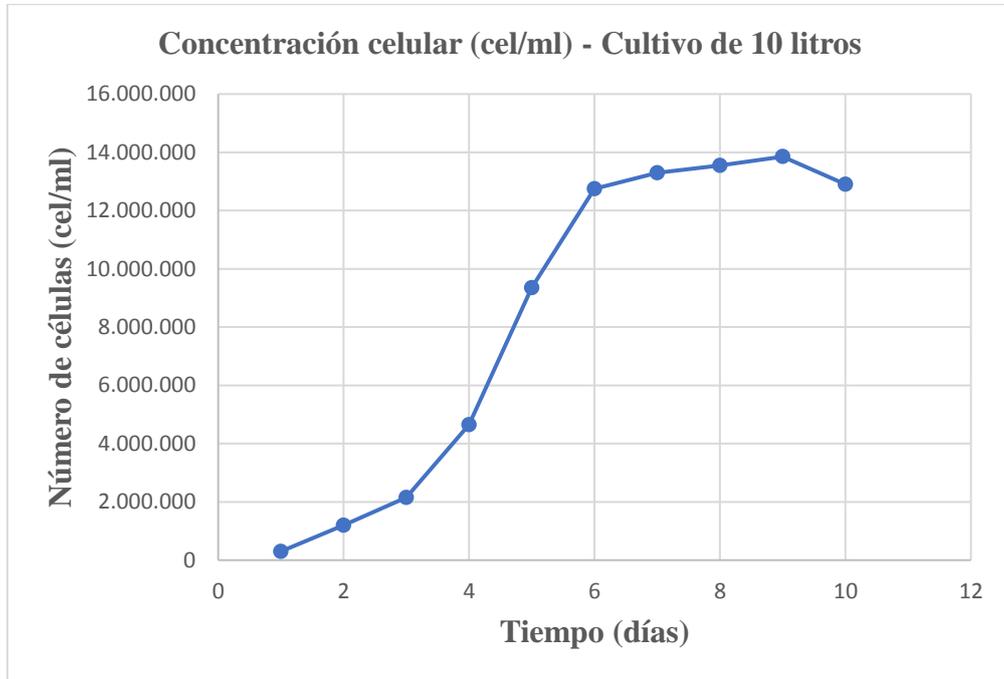
Tabla 9 Análisis realizados a muestra de biodiesel a partir de microalga

<b>PARÁMETROS</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>MÉTODO DE ANÁLISIS</b>
Poder calorífico	Cal/g	9457	ASTM D 240
Densidad °API	°API	12,06	ASTM D 287
Gravedad específica	---	0,9857	ASTM D 1298
Carbón residual	%(P)	0,10	ASTM D 189
Punto de inflamación	°C	112	INEN 808
Viscosidad cinemática a 40°C	Cst	4,14	INEN 928

Fuente: (Terán-Posada,2018)

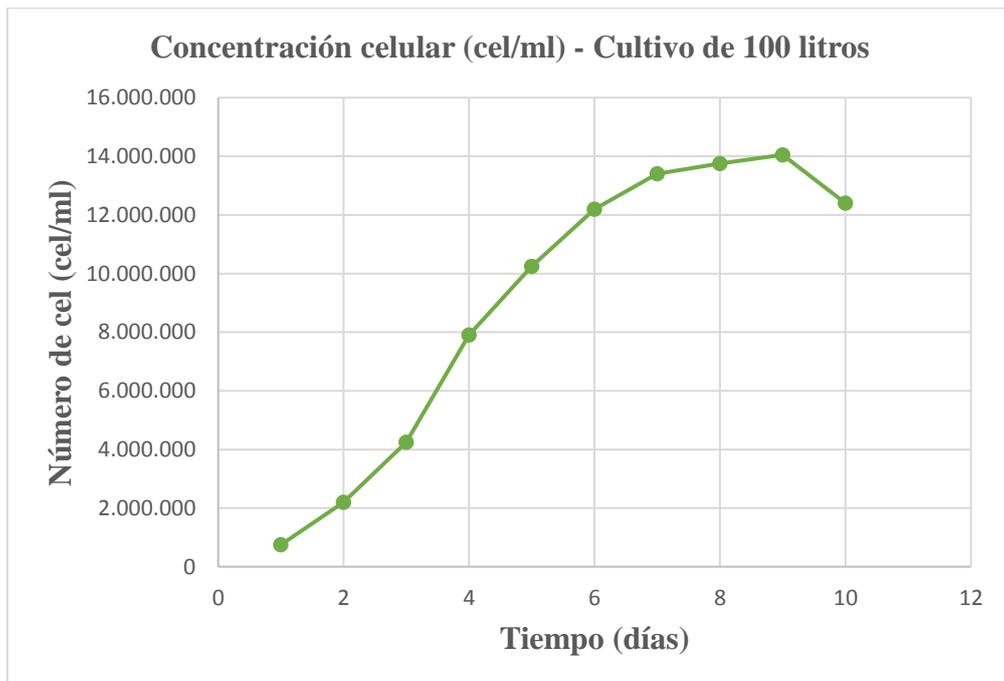
## 4.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### Crecimiento de microalga *Chlorella sp*



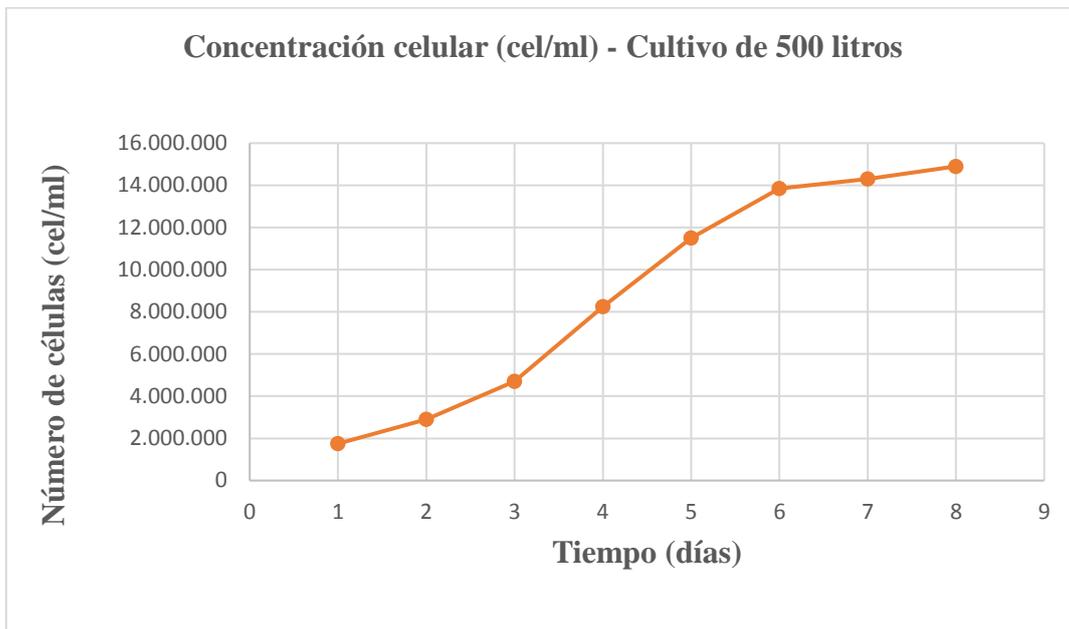
Gráfica 2. Curva de crecimiento del cultivo de 10 litros

Fuente: (Terán-Posada,2018)



Gráfica 3. Curva de crecimiento del cultivo de 100 litros

Fuente: (Terán-Posada,2018)



Gráfica 4. Curva de crecimiento del cultivo de 500 litros

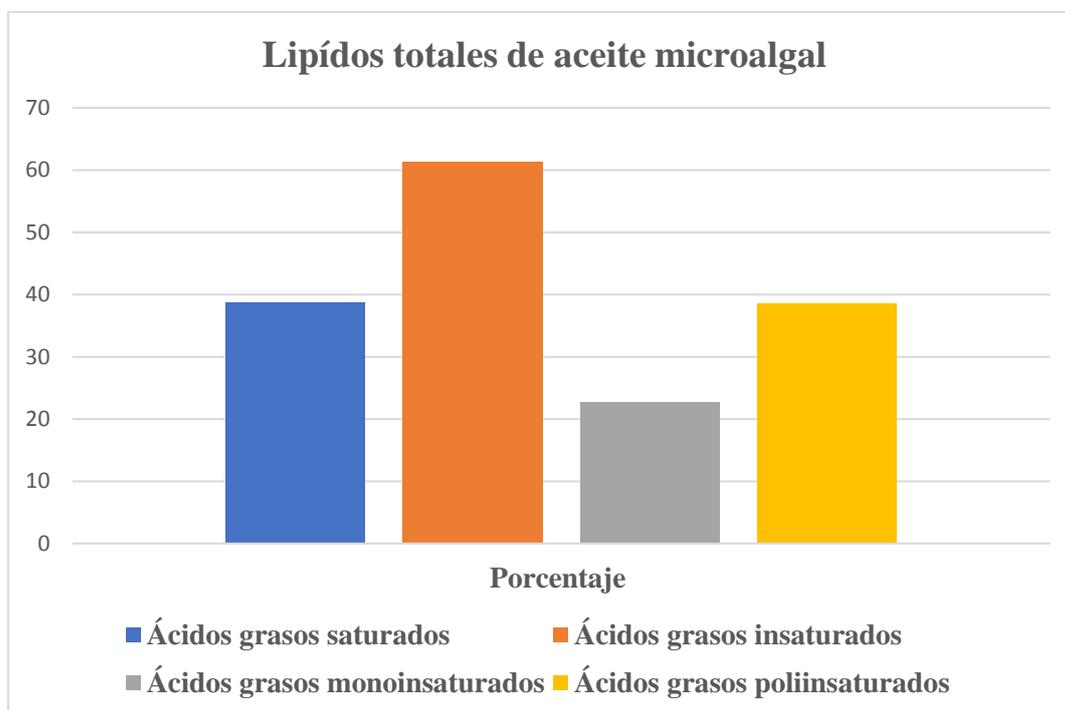
Fuente: (Terán-Posada,2018)

En la gráfica 2, 3 y 4 podemos observar las curvas de crecimiento celular de las microalgas *Chlorella sp* en un tiempo de 10 días. En el cultivo de 10 litros el número máximo de desarrollo en la etapa que se alcanza la mayor población celular fue de 13.550.000 – 13.850.000 células/ml y el mínimo fue entre 300.000 – 1.200.000 células /ml, en el cultivo de 100 litros el número máximo de crecimiento en la fase exponencial fue de 13.750.000-14.050.000 células/ml y el mínimo fue entre 750.000- 2.200.000 células /ml, en el cultivo de 500 litros el número máximo de crecimiento en la fase exponencial fue de 14.300.000-14.900.000 células/ml y el mínimo fue entre 1.750.000 – 2.900.000 células /ml.

### **Análisis de biomasa de las microalgas**

En la determinación del crecimiento de las microalgas, la ampliación de biomasa por día, en peso seco fue de 0.26, con una productividad de biomasa durante todo el cultivo de 0.126 (g bs/ g \* día), estos resultados se asemejan a los reportados en el artículo de Montero-Sánchez en el 2012 de 0.150 (g / L \* día) (Montero-Sánchez et al., 2012).

## Análisis de lípidos totales de aceite microalgal



Gráfica 5 Lípidos totales aceite microalga

Fuente: (Terán-Posada,2018)

En el perfil lipídico de los esteres metílicos presentes en el aceite, se reportó que el porcentaje de FAMES/LT de ácidos grasos saturados es 38,68%, de ácidos grasos insaturados es 61,32%, de ácidos grasos monoinsaturados es 22,76%, ácidos grasos poliinsaturados es 38,56%. En la composición de microalgas los ácidos grasos insaturados más importantes son el ácido palmitoleico, oleico y linoleico, con 11,37%, 11,39%, 25,10% respectivamente y ácidos grasos saturados como el palmítico con 10,06%. Hay otros tipos de ácidos grasos de cadena de carbonos impar que se producen biológicamente, se reporta la presencia de ácido Heptadecanoico con 15,25%.

Cabe recalcar que de acuerdo (Arias Peñaranda et al., 2013) los ácidos favorables para la generación de biodiesel son los ácidos grasos del tipo saturados y monoinsaturados, todos estos que están compuestos del carbono 16 al 20 en específico con más valor de transformación en metil-éster al ácido oleico (11,39% obtenido en este proyecto).

## Análisis del biodiesel obtenido.

Tabla 10. Tabla comparativa del biodiesel con el diésel convencional

Parámetros	Unidades	Biodiesel	Diésel tipo 1	Diésel tipo 2
Poder calorífico Inferior	kCal/kg	9457	10800 Fuente: (Pérez et al., 2016)	10800 Fuente: (Pérez et al., 2016)
Densidad °API	°API	12,06	---	---
Gravedad específica	---	0,9857	0,832	0,87-0,95
Carbón residual	%(P)	0,10	0,15	0,15
Punto de inflamación	°C	112	40 min	51 min
Viscosidad cinemática a 40°C	Cst	4,14	1,3 min	2,5 min
			3,0 max	6,0 max

Fuente: (Terán-Posada,2018)

En la tabla # 10 (**VER ANEXO B**) se hace una comparación del biodiesel obtenido con el Diésel convencional comercializado en nuestro país en base a los requisitos establecidos por la NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1489:99 (**VER ANEXO E**) en los parámetros punto de inflamación, carbón residual y viscosidad cinemática.

Los datos de la tabla antes mencionada nos indica que el biodiesel obtenido es un crudo pesado con 12,06 °API y gravedad específica de 0,9857. Con respecto al poder calorífico del biodiesel es 12,436 % inferior al diésel convencional, el poder calorífico fue de 9457 kCal/kg muy similar al de 9500 kCal/kg que reporta (Pérez et al., 2016) en su libro catalogado como Producción de Biodiesel mediante transesterificación in situ a partir de algas marinas, en cuanto a su punto de inflamación de 112°C es superior al establecido en las normas ecuatorianas, por el resultado mostrado de la viscosidad cinemática y de la gravedad específica el biodiesel se asemeja al diésel tipo 2.

### 4.3. CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo un cultivo total de 1000 litros de la microalga *Chlorella sp* en condiciones controladas con una temperatura de 18 a 22 ° C, nutridas con el medio de cultivo Guillar F/2, aireación constante y una luminosidad de 5250 lux determinando la concentración celular por el método de conteo utilizando la cámara de Neubauer, alcanzando la fase exponencial en el octavo día del cultivo con un total de 14.900.000 células/ml con una tasa de aumento de biomasa por día, basada en peso seco de 0,26 y una productividad durante todo el cultivo de 0.126 (g bs/ g \* día).
- La extracción del contenido lipídico de la biomasa de la microalga se efectuó mediante el método Soxhlet utilizando 400 gramos de biomasa seca con 1 litro de disolvente orgánico n-hexano obteniendo una productividad de 120 ml de aceite de *Chlorella sp* por cada kilogramo de biomasa seca obtenida.
- La caracterización del perfil bioquímico del aceite de microalga mediante cromatografía de gases acoplado a detección de ionización de llama muestra 38,68% de ácidos grasos saturados y 22,76% de ácidos grasos monoinsaturados, conteniendo ácidos grasos del subtipo de cadena larga con bajo nivel de insaturación como son ácido palmitoleico 11,37%, oleico 11,39%, y mirístico 3,11%, también los ácidos de cadenas de carbonos C<sub>16</sub> a C<sub>20</sub> como el linoleico 25,10% linolénico 7,59% palmítico 10,06% esteárico 4,50% todos estos son favorables para optimizar las propiedades de generación del biodiesel. Asimismo, se muestran otros tipos de ácidos presentes en el aceite como el láurico 5,76%, heptadecanoico 15,25%, y eicosapentaenoico 0,75% en diversas proporciones.
- La producción fue de 435 miligramos de biodiesel por cada gramo de aceite microalgal. En base a los resultados fisicoquímicos de la caracterización del biodiesel el poder calorífico fue de 9457 kCal/kg muy

similar al obtenido de 9500 kCal/kg por (Pérez et al., 2016) en su libro Producción de biodiesel mediante transesterificación en situ a partir de algas marinas. El biodiesel obtenido presenta características equivalentes al diésel tipo 2 de acuerdo con los parámetros de carbón residual 0,10 %(P) y viscosidad cinemática a 40 °C que dio 4,14 Cst establecidos como requisitos en la norma INEN 1489:99, también se estableció según su °API y gravedad específica como un crudo pesado.

#### 4.4. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la utilización de la biomasa que se genera de estas microalgas para consumo animal, debido a su composición bioquímica por ser una buena fuente de vitaminas y además tener un alto valor proteico siendo así un alimento beneficioso según se menciona en la tesis Producción de biodiésel a partir de microalgas. Análisis de ciclo de vida y factibilidad económica de (Palacios, 2013).
- Para estudios posteriores se sugiere utilizar otras cepas de microalgas que produzcan una mayor cantidad de biomasa en diversas condiciones de cultivo y por tanto se aproveche el perfil lipídico ideal para obtener biodiesel (Nuñez Castellanos, 2017).
- Se sugiere para proteger el medio ambiente la producción de microalgas con el fin de emplearlas como sistema de captura de grandes cantidades de CO<sub>2</sub> siendo una forma de atenuar los daños potenciales del efecto invernadero y darle diversas utilidades a su biomasa recolectada como se menciona en el “Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado” de (Bermeo Castillo, 2011).
- Se recomienda que para estudios posteriores se analice la puesta en funcionamiento de una planta de producción de biodiesel a partir de microalgas teniendo en cuenta un análisis de la factibilidad de inversión y reducción de costos de producción.

## 4.5. ABREVIATURAS

**CG:** Cromatografía de gases.

**FID:** Detección de ionización de llama.

**FAMES:** Esteres metílicos de Ácidos Grasos.

**LT:** Lípidos totales

**ND:** No detectable

**PUFA:** Ácidos grasos poliinsaturados.

**%v/v:** Porcentaje volumen/volumen

**%w/v:** Porcentaje peso/volumen

**cel:** Células.

**rpm:** Revoluciones por minuto.

**v/v:** Relación volumen/volumen.

**mg/g:** miligramo/gramo.

**Cel/ml:** células por mililitro

**°C:** grado Celsius.

**Cst:** centistokes

#### 4.6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C. S., Chang, I. A., Tenorio, L. G., Ynga, G. H., Oscanoa, A. H., Flores, L. R., ... Liz Tenorio García-Blásquez Qco Leenin Flores Ramos, I. (2011). *Compendio Metodológico Para La Extracción De Lípidos Totales A Partir De Biomasa Microalgal*. Lima, Perú. Retrieved from <http://www.imarpe.pe>
- Arévalo, J., & Malo, B. (2017). Evaluación Del Uso De La Microalga *Chlorella Vulgaris* En La Remoción De Materia Orgánica De Las Aguas Residuales De La Ptar El Salitre A Nivel Laboratorio.
- Arias Peñaranda, M., Martínez, A. de J., & Cañizares, R. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parametros del Cultivo que afectan la produccion de lipidos. *Acta Biológica Colombiana*, 18, 43–68. <https://doi.org/ISSN: 0120-548X>
- Bermeo Castillo, L. E. (2011). *Estudio Del Cosechado De Cultivos De Microalgas En Agua Residual Mediante Técnicas De Centrifugado*. Universidad de Cádiz.
- Cartagena Arévalo, J. C., & Malo, B. O. (2017). *Evaluación del uso de la microalga Chlorella Vulgaris en la remoción de materia orgánica de las aguas residuales de la ptar el Salitre a nivel laboratorio*. Fundación Universidad de América. Retrieved from <http://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/6035>
- Fernández-Linares, L. C., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A., & Badillo-Corona, J. A. (2012). Producción De Biocombustibles A Partir De Microalgas Production Of Biofuels Obtained From Microalgae. *Ra Ximhai*, 8(3), 101–115. Retrieved from <http://uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-25barticulosPDF/10Fernandez-Linares.pdf>
- Helm, M. M., Bourne, N., Lovatelli, A., Tall, M.-L., & Cigarría, J. (2006). *Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico*. Fao. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s07.htm>
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Flores, J., Barrios, F., & Zapata, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 159–164.

- Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/3236/323627686016/>
- Martínez Tristán, A. (2012). *Biosorción del colorante rojo congo en sistemas en lote utilizando biomasa de chlorella sp.* Universidad Autónoma de Nuevo León. Retrieved from <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080242015.PDF>
- Montero-Sánchez, Y., Gallo, A., Gómez, L. M., Álvarez, I., Sabina, L. C., Támara, Y., ... Ramírez, L. R. (2012). Investigación y Saberes 2012 Productividad De Lípidos Y Composición De Ácidos Grasos De Cinco Especies De Microalgas. *Investigación y Saberes, 1*(2), 37–43. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Yanet\\_Tambara\\_Hernandez/publication/257233224\\_Productividad\\_de\\_Lipidos\\_y\\_composicion\\_de\\_acidos\\_grasos\\_de\\_cinco\\_especies\\_de\\_microalgas/links/02e7e52559c7782277000000/Productividad-de-Lipidos-y-composicion-de-acidos-gras](https://www.researchgate.net/profile/Yanet_Tambara_Hernandez/publication/257233224_Productividad_de_Lipidos_y_composicion_de_acidos_grasos_de_cinco_especies_de_microalgas/links/02e7e52559c7782277000000/Productividad-de-Lipidos-y-composicion-de-acidos-gras)
- Nava, M. (2014). Tipos de petróleo crudo según grado API (liviano a extrapesado). Retrieved December 23, 2018, from <https://www.venelogia.com/archivos/9589/>
- Núñez Castellanos, M. D. P. (2017). *Cultivo a pequeña escala de microalgas de la especie chlorella vulgaris para la obtención de aceite.* Universidad Santo Tomás. Retrieved from <https://repository.usta.edu.co/handle/11634/4754>
- Palacios, I. (2013). *Producción De Biodiésel A Partir De Microalgas. Análisis De Ciclo De Vida Y Factibilidad Económica.* Retrieved from [https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/135/1/Tesis Itzel Palacios García.pdf](https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/135/1/Tesis%20Itzel%20Palacios%20García.pdf)
- Palomino, A. (2016). *Extracción de aceite de microalgas.* Universidad del Valle. Retrieved from <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/handle/10893/9135>
- Pérez, L., Salgueiro, J. L., & Maceiras, R. (2016). *Producción de Biodiesel mediante transesterificación in situ a partir de algas marinas.* (Meubook). Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Leticia\\_Perez\\_Rial/publication/305108885\\_Produccion\\_de\\_Biodiesel\\_mediante\\_transesterificacion\\_in\\_situ\\_a\\_partir\\_de\\_algas\\_marinas/links/578206ec08ae5f367d3b3980/Produccion-de-Biodiesel-mediante-transesterificacion-in-sit](https://www.researchgate.net/profile/Leticia_Perez_Rial/publication/305108885_Produccion_de_Biodiesel_mediante_transesterificacion_in_situ_a_partir_de_algas_marinas/links/578206ec08ae5f367d3b3980/Produccion-de-Biodiesel-mediante-transesterificacion-in-sit)
- Sacristán-De Alva, M., Luna-Pabello, V. M., Cadena-Martínez, E., & Alva-Martínez, A. F. (2014). Producción De Biodiésel A Partir De Microalgas Y

Una Cianobacteria Cultivadas En Diferentes Calidades De Agua Biodiesel Production From Microalgae And A Cyanobacteria Grown In Different Qualities Of Water. *Agrociencia*, 48(3), 271–284. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v48n3/v48n3a3.pdf>

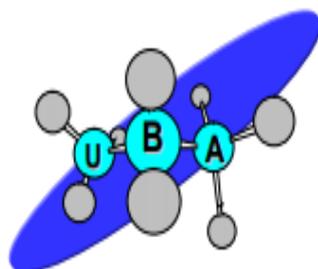
Tejeda-Benítez, L., Henao-Argumedo, D., Alvear-Alayón, M., & Castillo-Saldarriaga, C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas Characterization and lipid profile of oil from microalgae Caracterização e perfil lipídico de azeites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería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

Torrentera, L., & J. Tacón, A. (1989). La Produccion De Alimento Vivo Y Su Importancia En Acuicultura Una Diagnosis. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02.htm#chII>

# ANEXOS

## ANEXO A INFORMES

### RESULTADOS (PERFIL FAMES) DE ACEITE DE MICROALGAS



**Analytical  
Laboratories**  
Testing & Consulting

WWW.UBA-LAB.COM

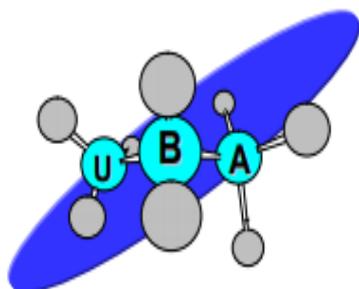
#### INFORME DE RESULTADOS IDR 23540-2018

Fecha: 14 de Diciembre del 2018

DATOS DEL CLIENTE						
Nombre	POSADA ESPINOSA MARCOS WELLINGTON					
Dirección	Samanes 4 Mz 411 V 27					
Teléfono	0981186870					
Contacto	Sr. Marcos Posada/Denis Teran					
DATOS DE LA MUESTRA						
Tipo de muestra	Aceite de Microalgas	Cantidad	Aprox. 10 mL			
No. de muestras	1 (n=1)	Lote	N/A			
Presentación	Frasco de vidrio	Fecha de recepción	04 de Diciembre del 2018			
Colecta de muestra	Realizado por el Cliente	Fecha de colecta de muestra	N.A.			
CONDICIONES DEL ANALISIS						
Temperatura (°C)	21.9	Humedad (%)	57.0			
Fecha de Inicio de Análisis	06 de Diciembre del 2018					
Fecha de Finalización del análisis	06 de Diciembre del 2018					
RESULTADOS						
CODIGO CLIENTE	CODIGO UBA	PARAMETROS	METODO	RESULTADOS	Unidad	Límite de Cuantificación
Aceite de Microalgas	UBA-23540-1	Perfil de Ácidos Grasos (FAME's)	AOCS Ce 1B-89	Se anexa	mg/g, %	50.0

#### PERFIL DE FAMES

Ácido Graso	FAME's	% FAMES/LT	mg/g
Capric Acid	10:0	N.D.	N.D.
Lauric acid	12:0	5,78	4,34
	12:1	N.D.	N.D.
Tridecylic acid	13:0	N.D.	N.D.
Myristic acid	14:0	3,11	2,34
Myristoleic acid	14:1	N.D.	N.D.
Pentadecylic	15:0	N.D.	N.D.
Palmitic acid	16:0	10,08	7,57
Palmitoleic acid (cis-9)	Cis-16:1(n-9)	11,37	8,56
Palmitelaidic acid (trans-9)	Trans-16:1(n-9)	N.D.	N.D.
Margaric acid	17:0	15,25	11,48
	16:2(n-6)	N.D.	N.D.
	16:2(n-4)	5,12	3,85
	16:3(n-4)	N.D.	N.D.
	16:4(n-1)	N.D.	N.D.
Stearic acid	18:0	4,50	3,39
Oleic acid (cis-9)	Cis-18:1(n-9)	11,39	8,58
Elaidic acid (trans-9)	Trans-18:1(n-9)	N.D.	N.D.
	16:4(n-3)	N.D.	N.D.
	18:3(n-4)	N.D.	N.D.
	18:2(n-9)	N.D.	N.D.



# Analytical Laboratories

Testing & Consulting

WWW.UBA-LAB.COM

Linoleic acid (cis, cis)	cis, cis 18:2(n-6)	25,10	18,90
Linoelaidic acid (trans, trans)	trans, trans 18:2(n-6)	N.D.	N.D.
Arachidic acid	20:0	N.D.	N.D.
g-Linolenic acid	18:3(n-6)	N.D.	N.D.
Linolenic acid	18:3(n-3)	7,59	5,71
	20:1(n-9)	N.D.	N.D.
	18:4(n-3)	N.D.	N.D.
Heneicosanoic acid	21:0	N.D.	N.D.
	20:2(n-6)	N.D.	N.D.
	20:3(n-6)	N.D.	N.D.
Behemic acid	22:0	N.D.	N.D.
	20:3(n-3)	N.D.	N.D.
Arachidonic acid	20:4(n-6)+	N.D.	N.D.
	22:1(n-11)	N.D.	N.D.
	22:1(n-9)	N.D.	N.D.
	20:4(n-3)	N.D.	N.D.
	21:5(n-3)	N.D.	N.D.
Eicosapentaenoic acid	<b>20:5(n-3) EPA</b>	<b>0,75</b>	<b>0,57</b>
Lignoceric acid	24:0	N.D.	N.D.
	22:4(n-6)	N.D.	N.D.
	22:4(n-3)	N.D.	N.D.
	22:6(n-6)	N.D.	N.D.
	22:5(n-3)	N.D.	N.D.
Docosahexaenoic acid	<b>22:6(n-3) DHA</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
	<b>Total Omega-3</b>	8,34	6,28
	<b>Total Omega-6</b>	25,10	18,90
	<b>Total Omega-9</b>	22,76	17,14
	<b>Relación n-3/n-6</b>	0,33	0,33
	<b>Total Saturados</b>	38,68	29,13
	<b>Total Insaturados</b>	61,32	46,17
	<b>Total Monoinsaturados</b>	22,76	17,14
	<b>Total Polinsaturados</b>	38,56	29,03
	<b>Total HUFA's</b>	0,75	0,57

#### Observaciones:

1. Los resultados emitidos en este informe, corresponden únicamente a la(s) muestra(s) recibidas por el laboratorio. No siendo extensivo a cualquier lote.
2. Este reporte no debe ser reproducido parcial o totalmente, excepto con la aprobación escrita por parte del laboratorio.
3. Nomenclatura: N.D. = No Detectable; LT. = Lípidos Totales; FAME's: Esteres metílicos de Ácidos Grasos.

## RESULTADO DE ANÁLISIS A BIODIESEL DE MICROALGA

	<b>LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA LESPEC – ESPOL</b>	<b>RESULTADOS DE ANÁLISIS</b>	<b>CÓDIGO:</b> LESPEC-MC2301-02
			Hoja 1 de 1

Ref. Solicitud N°: 262-2018

Área: HIDROCARBUROS

Fecha de recepción de muestra(s) en Laboratorio: 2018-12-16

Fecha de inicio / finalización de ensayo: 2018-12-16 / 2018-12-20

Analizado por: Ing. Tyrone Alcivar R.

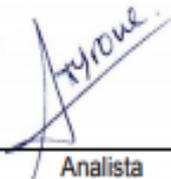
Fecha de entrega de reporte a Asistente Administrativa: 2018-12-20

Humedad / Temperatura promedio del Laboratorio: 50% / 26°C

Parámetros	Unidades	Resultados		Método de Análisis
Poder calorífico	Cal/g		9457	D 240
Densidad °API	°API		12,06	ASTM D287
Gravedad específica	---		0,9857	ASTM D1298
Carbón residual	%(P)		0,10	D 189
Punto de inflamación	°C		112	INEN 808
Viscosidad cinemática a 40 °C	Cst		4,14	INEN 928

Observaciones: Análisis realizados a muestra de Biodiesel a partir de microalgas

\_\_\_\_\_  
Director Técnico

  
\_\_\_\_\_  
Analista

Recibido por: \_\_\_\_\_ Fecha: 2018-...-...

## ANEXO B TABLA COMPARATIVA

Tabla 1. Tipos de crudo según su °API

<b>Crudo</b>	<b>Escala API</b>	<b>Densidad</b>	<b>Descripción</b>
Ligero	30-40°	0.87 - 0.83 g/cm <sup>3</sup>	Fácil transporte y extracción, ideal para refinar en combustibles y derivados.
Mediano	22-29.9°	0.92 - 0.87 g/cm <sup>3</sup>	Fácil transporte y extracción, ideal para combustibles y derivados.
Pesado	10-21.9°	1.00 - 0.92 g/cm <sup>3</sup>	Fácil transporte y difícil extracción, ideal para combustibles y derivados.
Extrapesados	Menos 10°	> 1.00 g/cm <sup>3</sup>	Difícil transporte y difícil extracción, ideal para derivados.

Fuente: (Nava, 2014)

## ANEXO C CÁLCULOS

### C.1 Determinación de tasa de aumento de biomasa de las microalgas por día

Calculamos:

$$C_b = r = \frac{(\ln(2.900.000) - \ln(1.750.000))}{2} = 0,25$$

$$C_b = r = \frac{(\ln(4.700.000) - \ln(1.750.000))}{3} = 0,32$$

$$C_b = r = \frac{(\ln(8.250.000) - \ln(1.750.000))}{4} = 0,38$$

$$C_b = r = \frac{(\ln(11.500.000) - \ln(1.750.000))}{5} = 0,37$$

$$C_b = r = \frac{(\ln(13.850.000) - \ln(1.750.000))}{6} = 0,34$$

$$C_b = r = \frac{(\ln(14.300.000) - \ln(1.750.000))}{7} = 0,30$$

$$C_b = r = \frac{(\ln(14.900.000) - \ln(1.750.000))}{8} = 0,26$$

### C.2 Productividad volumétrica de biomasa

Calculamos:

$$K = \frac{1}{14900000} * \left( \frac{(14900000 - 1750000)}{8 - 1} \right) = 0.126 \text{ (g bs/ g * día)}.$$

## ANEXO D MEDIO DE CULTIVO GUILLAR “F/2”

### PREPARACIÓN

#### Solución Primaria de Metales Traza

##### A. Con “Secuestrante Férrico” (Cloruro Férrico):

Disolver 5 gr del Secuestrante Férrico en 900 ml de agua destilada y añadir 1 ml de cada una de las soluciones primarias de metales traza preparados anteriormente; aforar a un litro y asegurar que el pH quede cerca de 4.5. Use 1 ml de esta solución por cada litro de agua de mar para hacer el medio de cultivo. Agua de mar filtrada (5 $\mu$ , 10 $\mu$ , etc.) y de ser posible irradiada con UV (Torrentera & J. Tacón, 1989).

##### B. Con EDTA y Cloruro Férrico (FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)

Disuelva 3.15 g de FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O ó 4.36 de EDTA (Na<sub>2</sub>) en 900 ml de agua destilada, agregue 1 ml de cada una de las soluciones stock primarias de metales traza y afore a 1 litro, asegure un pH de 2.0. Use 1 ml de esta solución por litro de agua de mar para preparar el medio “f/2” (Torrentera & J. Tacón, 1989).

Tabla 2. Medio Guillar F/2 - Metales Trazas

<u>Metales Traza</u>	<u>Solución Primaria</u>	
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.98</b>	<b>% w/v</b>
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	<b>2.2</b>	<b>% w/v</b>
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	<b>1.05</b>	<b>% w/v</b>
<b>CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	<b>1.0</b>	<b>% w/v</b>
<b>MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	<b>18</b>	<b>% w/v</b>
<b>Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.63</b>	<b>% w/v</b>

Fuente: (Torrentera & J. Tacón, 1989)

### **Solución Primaria de Vitaminas**

- Solución Primaria de Biotina: Se prepara a partir de cristales de B<sub>7</sub>, disolver 10 mg de biotina en 96 ml de agua destilada. Haga esta solución ligeramente ácida para ser autoclavada y manténgase en un congelador (Torretera & J. Tacón, 1989).
- Solución de Vitamina B<sub>12</sub>: A partir de Cyanocobalamina U.S. de 1000 mg/ml solución inyectable. Tomar 1 ml y aforarlo en 100 ml de agua destilada. La solución se acidifica para ser autoclavada y se congela (Torretera & J. Tacón, 1989).

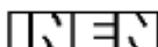
### **Solución Primaria de Vitaminas**

- Tomar 1 ml de la solución primaria de Biotina y 0.1 ml de la solución stock primaria de B<sub>12</sub>, aforar a 100 ml con agua destilada y añadir 20 mg de Tiamina HCl (Torretera & J. Tacón, 1989).
- Se pueden preparar ampollas de 2, 5 ó 10 ml y almacenarlas estériles (acidificas) en el congelador. Use ½ ml de esta solución por cada litro de agua de mar para preparar el medio "f/2" (Torretera & J. Tacón, 1989).

# ANEXO E NORMATIVA

## PRODUCTOS DERIVADOS DEL PETRÓLEO NTE INEN 1489:99

CDU: 662.75:662.94  
ICS: 75.160.20



CIU: 3530  
PE 02.02-404

Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	<b>PRODUCTOS DERIVADOS DEL PETRÓLEO. DIESEL. REQUISITOS</b>	<b>NTE INEN 1 489:99 Cuarta revisión 1999-08</b>
---	---	--

### 1. OBJETO

1.1 Esta norma establece los requisitos que debe cumplir el diesel que se comercializa en el país.

### 2. DEFINICIONES

2.1 **Diesel.** Es el combustible constituido por fracciones intermedias del petróleo.

2.2 **Diesel No. 1.** Es el combustible utilizado en máquinas que requieren cambios frecuentes de velocidad y carga, así como también para usos domésticos.

2.3 **Diesel No. 2.** Es el combustible utilizado para uso industrial y para motores de combustión interna de autoignición.

2.4 **Diesel No. 2 de bajo contenido de azufre.** Es el combustible utilizado en automotores de diesel, que requieren de bajo contenido de azufre y alta velocidad.

### 3. REQUISITOS

3.1 En la tabla 1, se indica los requisitos que debe cumplir el diesel No. 1.

**TABLA 1. Requisitos del diesel No. 1**

REQUISITOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
Punto de inflamación	°C	40	-	NTE INEN 1 047
Agua y sedimento	% en volumen	-	0,05	NTE INEN 1 484
Residuo carbonoso sobre el 10% del residuo de la destilación	% en peso	-	0,15	NTE INEN 1 481
Cenizas	% en peso	-	0,01	NTE INEN 1 482
Temperatura de destilación del 90%	°C	-	288	NTE INEN 926
Viscosidad cinemática a 37,8°C	cSt	1,3	3,0	NTE INEN 810
Azufre	% en peso	-	0,30	NTE INEN 1 480
Corrosión a la lámina de cobre	-	-	No.2	NTE INEN 927
Índice de cetano calculado	-	40	-	NTE INEN 1 485

3.2 En la tabla 2, se indica los requisitos que debe cumplir el diesel No. 2.

**TABLA 2. Requisitos del diesel No. 2.**

REQUISITOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
Punto de inflamación	°C	51	-	NTE INEN 1 047
Agua y sedimento	% en volumen	-	0,05	NTE INEN 1 484
Residuo carbonoso sobre el 10% del residuo de la destilación	% en peso	-	0,15	NTE INEN 1 481
Cenizas	% en peso	-	0,01	NTE INEN 1 482
Temperatura de destilación del 90%	°C	-	360	NTE INEN 926
Viscosidad cinemática a 37,8°C	cSt	2,5	6,0	NTE INEN 810
Azufre	% en peso	-	0,7	NTE INEN 1 480
Corrosión a la lámina de cobre	-	-	No.3	NTE INEN 927
Índice de cetano calculado	-	45	-	NTE INEN 1 485

(Continúa)

DESCRIPTORIOS: Productos del petróleo, diesel, requisitos

## ANEXO F FOTOGRAFÍA DE REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN

### REACTIVOS



Figura 1 Medio de cultivo Guillar F/2



Figura 2 Cloro



Figura 3 Cloroformo



Figura 4 Tiosulfato de sodio



Figura 5 Metanol



Figura 6 O tolidine

## REACTIVOS



Figura 7 Etanol



Figura 8 Hidróxido de Sodio

## EQUIPOS



Figura 1 Cromatógrafo de gases



Figura 2 Centrífuga



Figura 3 Rotavapor



Figura 4 Bombas de aireación



Figura 5 Balanza analítica



Figura 6 Sistema Soxhlet

## EQUIPOS



Figura 7 Microscopio bifocal



Figura 8 Cámara de Neubauer



Figura 9 Micropipetas



Figura 10 Autoclave