



Universidad del Bío-Bío
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería en Maderas
Escuela Ingeniería Civil Química



**REUTILIZACION DE BIOMASA MICROALGAL
Tetradismus obliquus, OBTENIDA DURANTE LA
OPERACIÓN DE UN SISTEMA DE RECIRCULACION
ACUICOLA, PARA LA PRODUCCION DE ACIDOS
GRASOS INSATURADOS EMPLEADOS EN LA
FABRICACION DE RESINAS EPOXICAS**

Informe de Habilitación Profesional presentado en conformidad a los
requisitos para obtener el título de Ingeniero Civil Químico

NICOLÁS ARTURO NADAL MOSCOSO

Profesor Tutor: PhD José Navarrete Araya

Ingeniero Supervisor: Javier Barros

Concepción, 15 de junio del 2021

RESUMEN

Con la finalidad de innovar, la depuración del agua en los sistemas de recirculación acuícola de la empresa FDM se realiza con microalgas y bacterias inmovilizadas en esferas de alginato (biofiltros). Sin embargo, la utilización de este tipo de biofiltro produce de manera permanente una biomasa microalgal, la cual debe ser removida cada cierto tiempo para no saturar el sistema debido a una sobreacumulación.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad en la reutilización de biomasa microalgal "*Tetradismus obliquus*" en la producción de ácidos grasos insaturados con potencial para ser utilizados a futuro como materia prima en la elaboración de resinas epóxicas. Para esto, la biomasa microalgal, previo a su recolección, fue cultivada y utilizada como agente depurador en un sistema de recirculación acuícola donde fueron medidos los parámetros de cultivo y la cantidad de biomasa inicial en mg/L. De forma posterior, se realizó un experimento comparativo simple en donde se evaluó la influencia que genera el factor de estrés salino (NaCl, 0.1M), de forma individual, "T2" y en conjunto de fosfato monopotásico (KH_2PO_4 , 115 μ M), "T3" en el perfil de ácidos grasos de la biomasa microalgal recolectada, respecto a un tratamiento control, "T.C" (solo agua destilada). De los resultados se puede concluir que la biomasa microalgal de la cepa *Tetradismus obliquus* si puede ser reutilizada para la producción de ácidos grasos insaturados, debido a que el porcentaje total de ácidos grasos poliinsaturados, altamente epoxidables, para "T3" (NaCl, 0.1M - KH_2PO_4 , 115 μ M) aumentó un 15,56% respecto al tratamiento control.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a los miembros de la empresa (FDM y DeNOVO) por su buena colaboración, su disposición de enseñarme y el permitirme utilizar sus implementos de laboratorio.

También deseo agradecer profundamente a mi profesor guía, el Sr. José Navarrete por su preocupación, su disposición, su paciencia y la gran cantidad de tiempo que invirtió en enseñarme y colaborar en la elaboración de este informe.

Sin duda alguna, aprendí e internalicé mucho mis conocimientos, como también mi experiencia a nivel laboral, saber enfrentar las situaciones con una mirada distinta a la que proporciona las enseñanzas de la Universidad.

Además, quiero mencionar en mis agradecimientos a algunos de mis profesores universitarios, como el Sr. Jorge Saavedra, Sr. Guillermo Reyes, Sra. Paola Bustos, Sra. Mabel Vega y en especial a la ex jefa de Carrera, la Sra. Laura Reyes. Ellos, además de poseer cualidades científicas, logran transmitir mensajes de experiencias de vida y de cómo enfrentar el mundo tanto en la cotidianidad como en el ámbito profesional.

Para finalizar me gustaría agradecer a todos mis amigos que me dieron una mano cuando me encontraba en momentos de cansancio físico y emocional, a mi madre, Sandra Moscoso Soto, la cual siempre confío en mí.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
TABLA DE CONTENIDOS	iii
NOMENCLATURA	iv
1. INTRODUCCIÓN	9
2. PLANTEAMIENTO SITUACIÓN PROBLEMA	11
3. REVISION BIBLIOGRAFICA	12
3.1. INDUSTRIA ACUICOLA	12
3.2. SISTEMA DE RECIRCULACION ACUÍCOLA (RAS)	13
3.3. BIOFILTRO MIXOTROFICO	14
3.4. PRODUCCION DE BIOMASA MICROALGAL	17
3.4.1. CONDICIONES DE CULTIVO	18
3.5. PRODUCCION DE ACIDOS GRASOS DE MICROALGA	19
3.5.1. FACTORES DE ESTRÉS EN EL CULTIVO MICROALGAL	20
3.6. ACEITE DE MICROALGA	23
3.7. RESINAS EPOXICAS	24
3.8. RESINAS EPOXICAS BIOBASADAS	25
4. OBJETIVOS	27
4.1. OBJETIVO GENERAL	27
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1. RECURSOS, MATERIALES Y EQUIPOS	28
5.2. PROCEDIMIENTO OBJETIVO ESPECIFICO 1	29
5.3. ACONDICIONAMIENTO DEL SISTEMA DE RECIRCULACION ACUICOLA (RAS)	29
5.4. CULTIVO DEL BIOMEDIO MIXOTROFICO	32
5.5. MADURACION DEL BIOMEDIO EN EL FOTOBIOREACTOR	34
5.6. PROCEDIMIENTO OBJETIVO ESPECIFICO 2	35
5.7. REUTILIZACION DE BIOMASA BAJO CONDICIONES DE ESTRES	35
5.8. RECOLECCION DE BIOMASA TRATADA	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1. Obtención de biomasa microalgal desde un sistema de recirculación acuícola, evaluando los parámetros de cultivo en el fotobiorreactor.	38

6.1.1. Determinación de compuestos de amonio, nitrito y fosfato en el sistema RAS.	38
6.2. Estudio del efecto de agentes estresantes sobre el perfil lipídico de la biomasa microalgal <i>Tetrademus obliquus</i>	41
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
7.1. CONCLUSIONES	46
7.2. RECOMENDACIONES	46
8. REFERENCIAS	47
9. ANEXOS	51
9.1. PROTOCOLO DE EXTRACCION LIPIDICA MICROALGAL (TEORICO)	51
9.2. RELACION ABSORBANCIA RESPECTO A LA CONCENTRACION DE BIOMASA MICROALGAL	52
9.3. CURVA DE CALIBRACION DEL AMONIO	52
9.4. CURVA DE CALIBRACION DEL NITRITO	53
9.5. CURVA DE CALIBRACION DEL FOSFATO	53
9.6. METODOS DE EPOXIDACION	53

NOMENCLATURA

FBR: Fotobiorreactor.

SRA: Sistema de recirculación acuícola.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

FTIR: Espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier.

BPA: Bisfenol A.

C(n):I: n corresponde a la cantidad de carbonos en la molécula y la letra i, la cantidad de doble enlaces, ejemplo -> C14:0 (14 carbonos, 0 enlaces dobles).

DGEBA: Ester diglicídico de bisfenol A (DGEBA).

PVC: Policloruro de vinilo.

NAT: Nitrógeno amoniacal total.

AG: Ácido graso.

AGS: Ácido graso saturado.

AGP: Ácido graso poliinsaturado.

AGM: Ácido graso monoinsaturado.

K: Temperatura de color (Kelvin).

Lux: Medida de la iluminancia.

PPM: Partículas por millón o mg/L.

EUFAME: Ésteres metílicos de ácidos grasos derivados de biomasa de algas.

INNOCON S.A: Empresa de servicios químicos.

Listas de figuras

Figura 1. Esquema de las implicaciones de los parámetros de cultivo de los consorcios microalgas-bacterias en el tratamiento de las aguas residuales.

Figura 2. Esquema y configuración de los reactores tipo “Airlift” (a), (b) y de un reactor tipo columna de burbujeo (c)

Figura 3. Categorías de productos comerciales basados en biomasa de microalgas.

Figura 4. Imagen conceptual que detalla los cambios morfológicos que se producen cuando la célula normal (A) se expone a condiciones hipersalinas.

Figura 5. Esquema de productos derivados del aceite de microalgas.

Figura 6. Estructura general del grupo epoxi.

Figura 7. Demanda de resina epoxi por zona a nivel global.

Figura 8. Comparación entre la estructura química de una red de ácidos grasos poliinsaturados respecto a la estructura del mismo ácido graso, pero epoxidado.

Figura 9. Esquema general del sistema de filtración FDM y sus posibles subproductos derivados de la biomasa microalgal.

Figura 10. Sistema de fotobiorreactores montado en el vehículo de transporte.

Figura 11. Desmontaje del sistema de fotobiorreactores.

Figura 12. Sistema de recirculación acuícola (RAS) de la piscicultura de Pangué modelado en 3D.

Figura 13. Montaje del sistema de filtración mecánica.

Figura 14. Sistema de iluminación montado en el fotobiorreactor.

Figura 15. Cultivo microalgal en el biorreactor por lote.

Figura 16. Cultivo bacteriano en el biorreactor por lote.

Figura 17. Sistema de cosecha y sus componentes.

Figura 18. Esquema y nomenclatura de los matraces en la experimentación.

Figura 19. Relación entre la absorbancia y concentración de biomasa microalgal (mg/L).

Figura 20. Curva de calibración para la medición de concentraciones de TAN (NH_4^+ , NH_3) en mg/L, volumen de muestras y reactivos (ejemplificación de uso de la tabla en amarillo).

Figura 21. Curva de calibración para la medición de concentraciones de NO_2^- (nitrito) en ug/L, volumen de muestras y reactivos (ejemplo de uso de la tabla para obtención de concentraciones en amarillo)

Figura 22. Curva de calibración para la medición concentraciones de fosfato (PO_4^{3-}) en mg/Volumen de muestra y reactivos (ejemplo de uso de tabla en recuadros amarillos)

Figura 23. Esquema de los tres mecanismos más utilizados para la síntesis química de epóxidos en la actualidad.

Figura 24. Epoxidación a base de esteres glicidicos.

Figura 25. Epoxidación de Corey.

Figura 26. Epoxidación a partir de halohidrinás

Figura 27. Epoxidación mediante sustitución nucleofílica.

Figura 28. Comparación del contenido de oxígeno del grupo epoxi respecto al tiempo para la epoxidación del aceite de soja con ácido peroxoacético y peroxofórmico a diferentes temperaturas.

Lista de tablas

Tabla 1. Indica el tipo de factor y su descripción en la incidencia metabólica microalgal

Tabla 2. Concentración de amonio, nitrito y fosfato obtenidas en las muestras de agua del fotobiorreactor.

Tabla 3. Concentración de oxígeno disuelto, valor de pH y temperatura obtenidas en las muestras de agua del fotobiorreactor.

Tabla 4. Concentración de la biomasa microalgal y su relación con la absorbancia cuantificada a 680 nm.

Tabla 5. Cantidad de masa seca de la biomasa microalgal obtenida para cada tratamiento bajo condiciones de estrés.

Tabla 6. Indica el tipo y la cantidad de ácidos grasos saturados para cada muestra, incluido los no identificados.

Tabla 7. Indica el tipo y la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados para cada muestra, incluido los no identificados, la cantidad de EPA y DHA que contienen y el total de OMEGA 6.

Tabla 8. Indica el tipo y la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados para cada muestra, incluido los isómeros del EPA, DHA, DPA y el total de ácidos grasos poliinsaturados en cada muestra.

Tabla 9. Reacciones químicas implicadas en la epoxidación de ácidos grasos insaturados.

1. INTRODUCCIÓN

Las resinas epóxicas en la actualidad son utilizadas en numerosas aplicaciones industriales. La demanda global de resinas epóxicas alcanzó el 2019 alrededor de 3,2 millones de toneladas métricas y se estima que el año 2025 alcanzará alrededor de 4,3 millones de toneladas métricas (Outlook, 2020).

En este escenario, numerosas investigaciones han demostrado la factibilidad de reemplazar de forma parcial las resinas epóxicas sintéticas por resinas epóxicas basadas en biopolímeros (biobasadas) (Fuentes, Del Sol, Veuthey, Vargas, & Ottone, 2018).

En el mercado actual la mayor cantidad de resinas epóxicas biobasadas utilizan aceites vegetales epoxidados como base monomérica. Estas materias primas son obtenidas a partir del cultivo de soya, linaza y palma. Sin embargo, los aceites y productos derivados de estos vegetales tienen un enfoque comercial destinado a la industria alimenticia, lo que limita su uso para la producción de biopolímeros (Pereira da Silva & Andre Ribeiro, 2019). Por otra parte, cultivos como el aceite de palma, requieren grandes áreas de tierra cultivable, generando una alta demanda de agua dulce empleada en sus sistemas de regadío. Una de las principales alternativas para mitigar estos inconvenientes corresponde a la producción de aceites a base de microalgas. El aceite obtenido de este microorganismo no es utilizado como fuente esencial en la alimentación humana, no requiere una superficie tan extensa para su cultivo y en algunas especies el contenido de ácidos grasos puede superar el 50% del peso seco de la célula (Freddy Leonard, 2009).

El perfil lipídico de los ácidos grasos depende de la especie de microalga y es un factor decisivo en la calidad del aceite producido. Estos se componen de ácidos grasos saturados e insaturados, los cuales poseen entre 12 a 22 átomos de carbono. Estudios sobre distintas cepas de microalgas de agua dulce han mostrado que la mayoría de los ácidos grasos son del tipo C14:0 (mirístico), C16:0 (palmítico), C18:1 (oleico), C18:2 (linoleico) y C18:3 (α -linoleico). (Tejeda, Henao, Alvear, & Rafael, 2015).

El perfil de ácidos grasos, su cantidad y composición se ve afectada por el ciclo de vida y las variables de cultivo. Los factores como la composición del medio, temperatura, intensidad lumínica, fotoperíodo y tasa de aireación inciden de forma directa en las vías metabólicas adaptativas del microorganismo.

Ciertas cepas de microalgas, bajo condiciones de estrés, pueden aumentar su contenido lipídico entre un 10 al 20% en peso seco.

Actualmente, existen varios obstáculos tecnológicos y económicos para la producción a escala industrial de biopolímeros a partir de aceite de microalgas. Al trabajar con microorganismos biológicos, se requiere identificar y optimizar las condiciones de cultivo que propicien la producción y acumulación intracelular de ácidos grasos, además de superar las limitaciones tecnológicas relacionadas con la operación de cosecha, post tratamiento y métodos de extracción (Tejeda et al., 2015).

El presente trabajo analizará la factibilidad en la producción de ácidos grasos de microalgas como posible materia prima en la síntesis de resinas epóxicas de base biológica.

2. PLANTEAMIENTO SITUACIÓN PROBLEMA

La depuración del agua en los sistemas de recirculación acuícola de la empresa FDM, se realiza con microalgas y bacterias inmovilizadas en esferas de alginato (biofiltros). La remoción de los biofiltros, al acabar su vida útil, produce de manera permanente una biomasa de microalgas sin valor comercial con un alto contenido de ácidos grasos (50%).

Las resinas epóxicas, ampliamente utilizadas en la fabricación de productos especializados, pueden ser sintetizadas mediante la reacción de ácidos grasos insaturados con un agente oxidante (resina epoxica biobasada). Al combinar este tipo de resinas con un agente de curado se forma un material termoestable altamente resistente.

La propuesta del presente proyecto consiste en estudiar la factibilidad en la reutilización y la exposición de la biomasa microalgal a distintos factores estresores con la finalidad de obtener la mayor cantidad ácidos grasos insaturados, utilizados como fuente de materia prima para la producción de resinas epóxicas.

El beneficio en la producción de aceites de microalgas se debe a que genera un menor impacto en el área ambiental, reduciendo la cantidad de superficie y agua utilizada en comparación de los aceites obtenidos mediante el cultivo de la materia vegetal (Negrell, Cornille, De Andrade, Jean Jaques, & Caillol, 2016).

3. REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1. INDUSTRIA ACUICOLA

La acuicultura comercial a nivel nacional tiene sus inicios en la década de los 80 debido a las nuevas políticas económicas impulsadas por el gobierno militar. Estas incentivaron la actividad privada, la apertura al comercio internacional y, además, nacieron como una respuesta a la situación de sobreexplotación de los stocks pesqueros locales de las especies destinadas al mercado internacional (Norambuena & González, 2021).

La producción acuícola en Chile tiene un gran enfoque hacia el cultivo de trucha y salmón, representando el 84 % de la producción acuícola nacional y prácticamente el 100% de la producción de peces originados en la acuicultura. De forma neta, la producción de este país representa un 26 % del mercado global (Editec, 2019), teniendo volúmenes de producción cercanos a las 953.296 toneladas, tomando como referencia el año 2019 (Consejo del Salmon, 2021).

El espacio y la demanda de agua limpia es esencial para realizar las prácticas de acuicultura, esta funciona como un vector, aportando oxígeno, minerales, nutrientes y como reservorio de los elementos de desecho de los organismos. La producción acuícola finaliza con la obtención de los productos deseados (peces) y desechos derivados de éstos, entre los que se encuentran los alimentos no consumidos, plásticos, estructuras metálicas, productos de excreción, materias fecales, químicos, microorganismos nocivos y parásitos. Muchos años realizando esta actividad han generado y sometido a los ecosistemas del sur de Chile a una inmensa modificación artificial. Estos múltiples cambios generaron un efecto negativo sobre el medio ambiente, poniendo en riesgo la integridad tanto para el ser humano como a los animales de la zona. Por ello los sistemas de producción acuícola en sistemas recirculados han sido desarrollados como respuesta a esta problemática ambiental. Estos deben estar diseñados de forma adecuada para generar un ambiente óptimo para el crecimiento de los cultivos acuáticos teniendo en cuenta la remoción de los desechos producidos por estos organismos (CONICYT, 2015).

Los sistemas de recirculación acuícolas están enfocados en la producción de salmónidos en su fase de crecimiento en agua dulce. Hoy en día, el 100% de las pisciculturas cuenta con sistemas de tratamiento de residuos líquidos y más de un 25% de ellos cuentan con

modelos de recirculación de agua, lo que les permite reutilizarla mediante la aplicación de modernos sistemas de tratamientos (Editec, 2020)

3.2. SISTEMA DE RECIRCULACION ACUÍCOLA (RAS)

El sistema de recirculación acuícola (RAS) es un sistema cerrado diseñado para el cultivo de organismos acuáticos en donde el agua es continuamente limpiada y re utilizada mediante un conjunto de procesos y equipos diseñados para esta finalidad. Los sistemas de recirculación acuícola reutilizan el agua reduciendo la necesidad de esta hasta un 90% respecto a un cultivo no recirculado de volumen similar. El agua utilizada es tratada de manera física, química y biológica, removiendo sólidos en suspensión y desechos orgánicos derivados de los peces (Libey, 1993).

Los sistemas de producción de esta categoría son una respuesta considerable respecto a las problemáticas medioambientales asociadas a la acumulación de desechos orgánicos en aguas fluviales, siempre y cuando se proporcione y mantenga un ambiente bajo control en el sistema. El desafío de este sistema reside en la mantención de los parámetros bioquímicos, como el oxígeno disuelto, nitrógeno amoniacal, nitritos, dióxido de carbono, temperatura y pH en niveles adecuados para la vida y el crecimiento óptimo de los peces. Para que un sistema de recirculación sea eficiente, se deben tomar cinco aspectos de vital importancia. Estos son (Masser & Losordo, 2006):

- Remoción de sólidos, en el cual se remueven los desechos producidos en los sistemas, tales como el alimento no ingerido por los peces y las fecas liberadas por estos mismos.
- Sistema de aireación u oxigenación, el cual genera un aporte adicional de aire u oxígeno al agua, disolviéndose en esta y pudiendo ser respirada por los peces.
- Desgasificación, el cual consiste en la eliminación del dióxido de carbono en exceso, el cual es liberado por estos organismos en su proceso de respiración celular.
- Adecuada recirculación de agua, el cual está dado por las instalaciones hidráulicas y bombas dentro del sistema.
- Procesos de biofiltración, el cual tiene la finalidad de controlar los compuestos y moléculas nitrogenadas, producto del metabolismo de los organismos (Losordo M, Masser P, & James, 1998).

3.3. BIOFILTRO MIXOTROFICO

Los desechos orgánicos acumulados en un sistema de recirculación acuícola son tratados utilizando un sistema de depuración orgánica de base biológica (biofiltros). Los biofiltros mixotrofos se componen por un consorcio microalga-bacteria, los cuales generan una sinergia en su metabolismo aprovechando los componentes residuales de cada microorganismo. Estos cumplen su objetivo controlando el nivel de fosfato y el nitrógeno amoniacal total (NAT) del sistema (Quiñones, 2018).

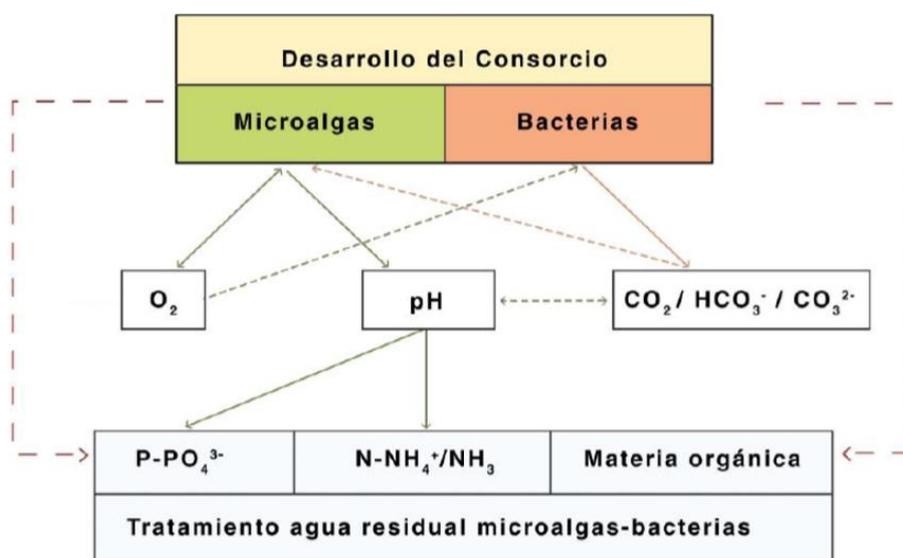


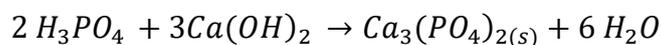
Figura 1. Esquema de las implicaciones de los parámetros de cultivo de los consorcios microalgas-bacterias en el tratamiento de las aguas residuales (Barreiro, 2019).

Las bacterias depuran los compuestos nitrogenados mediante la nitrificación, proceso en el cual se tiene dos reacciones fundamentales.

Etapa	Reacción Química
[1]	$NH_4^+ + 1.5O_2 \rightarrow 2H^+ + H_2O + NO_2^-$
[2]	$NO_2^- + 1/2 O_2 \rightarrow NO_3^-$

En la primera reacción el amonio es oxidado a nitrito por la acción de bacterias del género “*Nitrosomas*”. La segunda reacción consiste en la oxidación de nitrito a nitrato, realizado por las bacterias del género *Nitrobacter* (Jarpa, 2017).

Por otra parte, para las microalgas, el fósforo es un elemento indispensable para su crecimiento, ya que lo precisan para la síntesis de ácidos nucleicos, intermediarios energéticos (ATP) y para la síntesis de fosfolípidos. En los consorcios formados por microalgas-bacterias, la eliminación del fosforo se realiza mediante dos mecanismos. Uno de los mecanismos consiste en la asimilación directa para formar biomasa y el segundo en la precipitación química del fosfato en forma de fosfato de calcio (Barreiro, 2019).



Fotobiorreactores

Los fotobiorreactores son equipos diseñados para cultivar microorganismos que requieran luz y condiciones controladas para el desarrollo de su metabolismo. La utilización de microalgas como agente depurador requiere cultivar estos microorganismos en condiciones fotótrofas, para ello es necesario el empleo de fotobiorreactores (FBRs) que deben ser diseñados, construidos y operados de manera específica para satisfacer los requerimientos del proceso biotecnológico. Los FBRs permiten el cultivo masivo de microalgas manteniendo un medio estable de temperatura, luz, pH, concentración de oxígeno y nutrientes. Para garantizar una distribución homogénea de estos elementos, los FBRs deben disponer de sistemas de agitación que permitan mantener los microorganismos en suspensión, promover el acceso a los nutrientes y la luz, y evitar así la formación de gradientes que puedan dificultar el desarrollo del bioproceso (Acien et al., 2013).

Fotobiorreactores de columna de burbujeo (Bubble Air Column)

Los fotobiorreactores de columna de burbujeo son reactores cilíndricos con disposición vertical, en donde un gas entra en contacto con un líquido para generar agitación y permitir la síntesis de productos químicos o biológicos (Jimenez, 2014). Este tipo de fotobiorreactores cerrados, como regla general, consisten en una columna construida con un material transparente, con un diámetro comprendido entre los 5 y los 50 centímetros, y de altura entre 1 y 3 metros. (Vicente, 2019).

Fotobiorreactores “Airlift”

Los fotobiorreactores “Airlift” se diferencian de los de columnas de burbujeo, porque en ellos las corrientes de flujo ascendentes se separan físicamente de las descendentes. Para ello, los reactores airlift cuentan con varias estructuras bien definidas (Doran, 1998):

- Columna de burbujeo (Riser): Guía a las burbujas hacia el separador de gases. En ella el flujo es ascendente.
- Columna de flujo descendente (“Downcomer”): No alberga burbujas, en este lugar se establece un flujo descendente debido a una mayor densidad aparente respecto al “Riser”.
- Separador de gases: Se ubica en el extremo superior del reactor. En este lugar ocurre la separación de las burbujas que llegan por el “riser”.
- Base: Corresponde a la parte inferior del reactor. En este lugar se une el “riser”, lugar en donde se introducen las burbujas, con el “downcomer”.

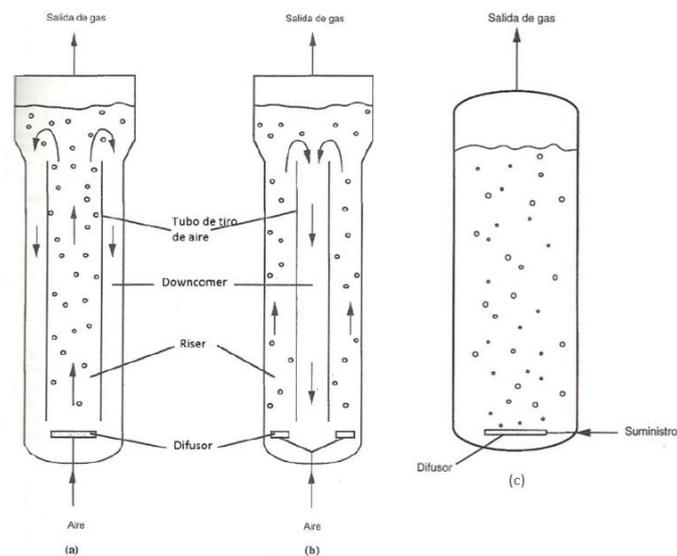


Figura 2. Esquema y configuración de los reactores tipo “Airlift” (a), (b) y de un reactor tipo columna de burbujeo (c) (Doran, 1998).

El éxito de la producción de biomasa y compuestos químicos por las microalgas dependen de gran forma del diseño de los fotobiorreactores. Los FBR presentan mayores ventajas que los sistemas cerrados siendo el control de las condiciones de cultivo la de mayor importancia. Considerando también los factores económicos, los FBR son hoy en día reconocidos por su alta producción de biomasa y bajo costo comparados a los sistemas

abiertos (Chisti, 2007). además de ofrecer una mayor productividad y calidad de la biomasa generada (Benavente-Valdés & N Aguilar, 2012).

3.4. PRODUCCION DE BIOMASA MICROALGAL

Microalgas

Las microalgas son microorganismos unicelulares y su metabolismo energético principal esta dado por la fotosíntesis. En esta clasificación se encuentran las algas eucariontes y las cianobacterias, más conocidas como algas verdes y azules. Su tamaño puede llegar a los 200 micrómetros en las cianobacterias y entre los 0,5 a 30 micrómetros para las microalgas. Estas pueden alimentarse tanto de materia orgánica como inorgánica, lo cual los clasifica como organismos fotoautótrofos, heterótrofos y mixotrofos, donde estos últimos pueden asimilar moléculas de carbono orgánicas y dióxido de carbono (Raja, Shanmugam, & Ganesan, 2014).

La mayoría de las microalgas se desarrollan en un rango de temperatura de 15°C a 35°C. Las cepas más utilizadas a nivel industrial son del género *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Phormidium*, *Spirulina* y algunas cianobacterias debido a su alta tasa de crecimiento, tolerancia y adaptación a distintos tipos de medios de cultivo. Este microorganismo se utiliza como alimento acuícola, filtro biológico al depurar agua residual, producción de fertilizantes, combustibles, colorantes, aditivos alimentarios y productos cosméticos. La composición de las proteínas, carbohidratos y lípidos varía según la especie y pueden ser modificados manipulando los parámetros de cultivo dependiendo del uso que se le desea dar (Benavente, Aguilar, Montanez, & Mendez, 2021).

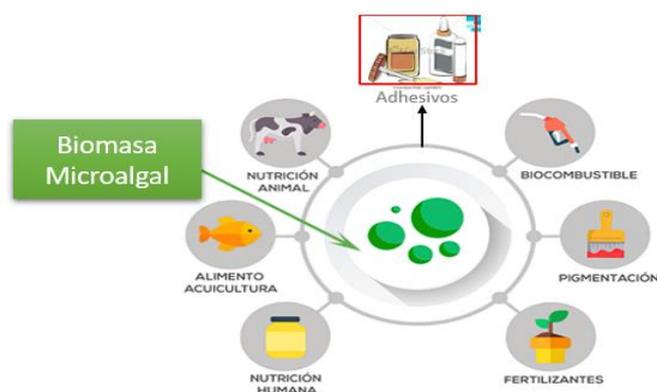


Figura 3. Categorías de productos comerciales basados en biomasa de microalgas.

3.4.1. CONDICIONES DE CULTIVO

Existen diversas variables que afectan el crecimiento y la acumulación de metabolitos en las microalgas. La tabla 1 detalla los distintos factores que afectan a los cultivos de microalgas, sus efectos e interacciones en estos microorganismos.

Tabla 1. Indica el tipo de factor y su descripción en la incidencia metabólica microalgal (Benavente-Valdés et al., 2021).

Factor	Descripción
Luz	La tasa específica de crecimiento de las microalgas depende de la intensidad de la luz. El crecimiento de las microalgas se incrementa conforme la intensidad de luz aumenta. Cuando la tasa de crecimiento llega a su punto máximo, ésta disminuye con el incremento de la intensidad de la luz debido a la fotoinhibición.
Temperatura	Comúnmente, los cultivos de microalgas toleran temperaturas de entre 16 y 27 °C. Temperaturas menores a 16 °C disminuyen el crecimiento, mientras que una temperatura mayor a los 35 °C resulta ser letal para un gran número de especies (Mehlitz, 2009). Los cambios en la temperatura causan alteraciones en muchas de las rutas metabólicas, incluyendo la biosíntesis de los carotenoides y ácidos grasos.
pH	Las microalgas tienen diversos requerimientos de pH para su crecimiento. A niveles de pH alcalinos, la disponibilidad de CO ₂ puede ser limitante para el crecimiento y la fotosíntesis de microalgas. El rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7.
Mezclado	Para cualquier tipo de reactor usado en el cultivo de algas un mezclado eficiente debe ser proporcionado con el fin de producir una dispersión uniforme de las microalgas en el medio de cultivo, eliminando así los gradientes de concentración de luz, nutrientes, CO ₂ y temperatura.
Transferencia de gas	Para el crecimiento microalgal, es necesario que en el medio se encuentre una fuente de carbono inorgánico. El carbono constituye cerca del 50 % de la biomasa de la microalga. Por este motivo, al realizar la fotosíntesis es el componente que limita el crecimiento celular.
Nutrientes	Para que las microalgas puedan crecer, es necesario que se encuentren en un medio con nutrientes de disolución. Los nutrientes fundamentales para el crecimiento de las microalgas son el carbono, el nitrógeno y el fósforo.
Salinidad	El efecto salino genera cambios en la composición y estructura de la membrana celular de la microalga. De forma particular, las microalgas suelen adaptarse a un ambiente salino aumentando la proporción de ácidos grasos celulares y producción de metabolitos intermediarios como el B-caroteno, dependiendo de la especie.

Teniendo en cuenta lo anterior, es importante determinar las condiciones óptimas de cultivo según la finalidad del proceso o producto que se desea obtener. La exposición de las microalgas a cambios ambientales inducidos artificialmente (factores) pueden generar distintas repuestas metabólicas como método de adaptación. Uno de ellas corresponde a la modificación de la composición lipídica del microorganismo, con la finalidad de mantener el grado de fluidez adecuado en la membrana celular. Estos cambios se generan cuando la microalga se somete a un estrés salino y/o deficiencia de nutrientes esenciales como el fosfato y el nitrato, los cuales tienen un rol indispensable en la fisiología, el crecimiento y la producción de ácidos grasos intracelulares (Salem, 2013).

3.5. PRODUCCION DE ACIDOS GRASOS DE MICROALGA

Lípidos y ácidos Grasos

Los lípidos son un grupo heterogéneo de moléculas que comparten la propiedad de ser altamente hidrofóbicas y solubles en solventes de tipo orgánico. Los lípidos varían su estructura desde cadenas simples de hidrocarburos como lo son los ácidos grasos hasta moléculas más complejas, como los triacilgliceroles y fosfolípidos. Los lípidos y ácidos grasos desempeñan una serie de funciones clave en el metabolismo de los organismos, desde ser la principal reserva de energía hasta la mantención estructural de la membrana plasmática en las células. Estos pueden diferir en el número de átomos de carbono, saturación, posición y orientación de dobles enlaces en su estructura. Debido a esto, los ácidos grasos se pueden dividir en los siguientes grupos (C. Burdge & C. Calder, 2015).

Ácidos grasos saturados (AGS): Los ácidos grasos saturados se conforman por enlaces simples de carbono a carbono, no poseen doble ni triple enlaces, lo que se traduce en una gran estabilidad y la propiedad de ser sólidos a temperatura ambiente. Los ácidos grasos saturados predominan en consumibles de origen animal, no obstante, se suelen encontrar en grandes cantidades en alimentos de origen vegetal, como los aceites de coco, palma y de algas, también llamados tropicales, el ácido esteárico (C18:0), es un ejemplo de AGS.

Ácidos grasos monoinsaturados (AGM): Los ácidos grasos monoinsaturados poseen un doble enlace en su estructura. Por ejemplo, el ácido oleico (C18:1) principal componente del aceite de oliva (Carvajal, 2010).

Ácidos grasos poliinsaturados (AGP): Los ácidos grasos poliinsaturados poseen doble o triple enlaces en su estructura, aumentando la probabilidad de entrelazamiento de la grasa debido a su alta reactividad. Los peces y ciertos alimentos de origen vegetal, como los aceites vegetales están enriquecidos en AGP dentro de su estructura. Un ejemplo típico de este AGP es el ácido linoleico (C18:2).

3.5.1. FACTORES DE ESTRÉS EN EL CULTIVO MICROALGAL

En condiciones óptimas de crecimiento se producen grandes cantidades de biomasa microalgal, pero con contenidos lipídicos relativamente bajos. Por su contra parte, en condiciones ambientales desfavorables (estrés), las microalgas alteran sus rutas biosintéticas hacia la formación y acumulación de lípidos neutros, principalmente en forma de triglicéridos. Este proceso permite que las microalgas puedan adaptarse a condiciones ambientales adversas. Los principales estímulos químicos que inducen dicho estado metabólico son la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad, el pH del medio de cultivo y la temperatura (Coboz Ruiz, Paredes Rodriguez, & Castro Gomez, 2015).

Salinidad

El estrés producido por la salinidad genera cambios morfológicos y moleculares en el interior de la célula. Estos procesos ocurren de forma simultánea con la finalidad de mejorar la supervivencia del microorganismo. Para poder resistir la presión osmótica inducida por la salinidad, la microalga reajusta la absorción y liberación de iones a través de la membrana celular. La mayoría de las cepas microalgales expuestas a condiciones poco favorables entran en una fase temporal denominada “palmeloide”, en esta forma se producen múltiples cambios estructurales, los cuales incluyen, el incremento de proteínas de transporte en la membrana (B), acumulación de solutos osmorreguladores (C), degradación de complejos de captación de luz (D), agrupación celular (E), pérdida de flagelos (F), aumento de la producción de exopolisacáridos (EPS) y engrosamiento de las paredes celulares individuales (G), mediante cambios en la composición de ácidos grasos y proteínas en la membrana celular, como se muestra en la imagen siguiente (Shetty, Mukami, & Gergely, 2019).

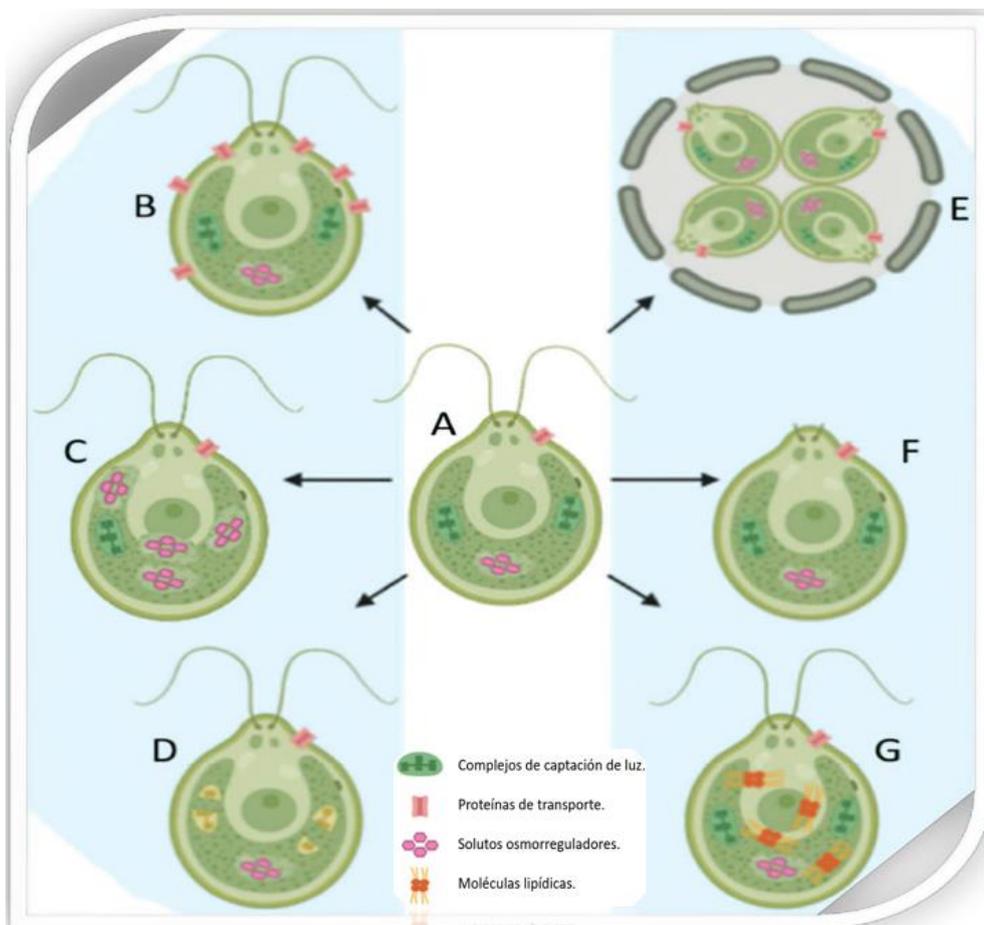


Figura 4. Imagen conceptual que detalla los cambios morfológicos que se producen cuando la célula normal (A) se expone a condiciones hipersalinas (Shetty et al., 2019).

Debido a esto, la mayoría de las algas verdes sometidas a estrés salino muestran una acumulación particular de lípidos. Esta respuesta adaptativa se ha estudiado bastante en la última década, con la finalidad de obtener biocombustibles a gran escala (Shetty et al., 2019).

Inanición (Fosforo y Nitrógeno)

A nivel industrial, las microalgas se cultivan en medios con nutrientes suficientes con la finalidad de obtener una mayor concentración de biomasa en el menor tiempo posible. La falta de nutrientes se introduce en etapas posteriores para la sobreproducción de lípidos. La variación de macronutrientes como el nitrógeno, el fósforo y el azufre en los medios de cultivo conducirá a la alteración de la composición macromolecular de las células microalgales. Bajo estrés nutricional, se favorece la acumulación de lípidos. Numerosos

estudios han informado de que la mayoría de las especies de microalgas pueden mejorar la acumulación de lípidos bajo estrés nutricional (Yang, Xiang, Li, & Long, 2018).

Fosfato

El fósforo desempeña un papel importante en el crecimiento de las algas, producción de lípidos, acumulación de ácidos grasos, procesos metabólicos enfocados en la transferencia de energía, la transducción de señales celulares y la fotosíntesis (Yang et al., 2018). Este nutriente constituye aproximadamente el 1% del total de la biomasa de las algas y se requiere aproximadamente en un 0,03-0,06% en el medio para mantener el crecimiento adecuado de este microorganismo (Procházková, Brányiková, Zachleder, & Brányik, 2013).

Las microalgas pueden acumular más fósforo de los necesarios para su crecimiento en forma de ortofosfato (PO_4^{3-}) y polifosfato. Este mecanismo es imprescindible para la supervivencia, ya que estos compuestos pueden convertirse en adenosín trifosfato (ATP) en condiciones nutricionales desfavorables. El ATP es la fuente de energía principal para la realización de la respiración celular y el proceso fotosintético en la célula microorganismo (Procházková et al., 2013).

La limitación de fósforo es un factor ambiental eficiente para inducir la acumulación de lípidos. Estudios realizados con la cepa *Scenedesmus sp* cultivadas en un medio que contenía 50 mg/L de fósforo alcanzó un contenido en lípidos del 22,3%, mientras que el rendimiento lipídico para un medio con una concentración de fosforo de 1 mg/L alcanzó el 42,5% (Azrina Yaakob et al., 2020).

Nitrógeno

El nitrógeno es un macronutriente esencial para el crecimiento de las microalgas. Este desempeña un rol importante en la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos. La concentración de nitrógeno impacta significativamente en el crecimiento de las microalgas y en su composición bioquímica. Su agotamiento en el medio de cultivo provoca una disminución del crecimiento microalgal (Yang et al., 2018).

Las microalgas pueden asimilar el nitrógeno en forma de nitrato, nitrito, urea y amonio. Sin embargo, el nitrato se utiliza de forma habitual para el cultivo de microalgas en comparación con las sales de amonio, esto se debe a que esta molécula tiene menor

reactividad, manteniendo los niveles de pH estables en el medio cultivo (Azrina Yaakob et al., 2020).

La limitación artificial de nitrógeno en el medio de cultivo puede disminuir la producción de biomasa, pero aumentar la producción de lípidos. Así lo demostraron (Xu, Zhang, Fan, Han, & Zeng, 2001), quienes observaron que una disminución del suplemento de amonio ingresado en el medio conlleva a una reducción en el nivel del pH y en la tasa de crecimiento para la microalga *Ellipsoidion sp.* Sin embargo, de forma simultánea a al proceso anterior, se observó una mayor acumulación de ácido eicosapentaenoico (EPA) y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) respecto al medio alto en concentración de amonio.

Estudios realizados por (Yang et al., 2018) demostraron que la acumulación de biomasa en *Chlamydomonas reinhardtii* se inhibió bajo la deficiencia de nitrógeno hasta el 31,7%, con aumentos simultáneos en el rendimiento total de acumulación de ácidos grasos de hasta el 93%. Por lo tanto, puede concluirse que la concentración de nitrógeno favorece una mayor productividad de la biomasa, y que el agotamiento del nitrógeno desplaza el flujo hacia la producción de lípidos en la mayoría de las cepas microalgales.

3.6. ACEITE DE MICROALGA

El aceite de microalgas es una fuente no comestible de triglicéridos que posee carotenoides, antioxidantes, enzimas, péptidos, esteroides, ácidos grasos esenciales y una gran cantidad de ácidos grasos insaturados. Debido a esta composición, puede ser utilizado como fuente de materia prima en la producción de polímeros de base biológica, tales como bio-combustibles y ácidos grasos epoxidados (Negrell et al., 2016).

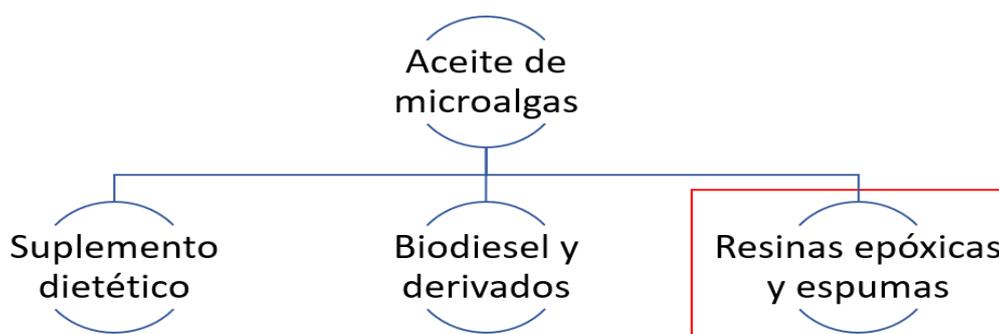


Figura 5. Esquema de productos derivados del aceite de microalgas.

Los ácidos grasos epoxidados derivados del aceite microalgal proporcionan una base para la construcción de compuestos poliméricos de origen renovable. Los productos elaborados mediante estos nuevos polímeros pueden utilizarse en sistemas electrónicos, eléctricos, adhesivos de alto rendimiento, materiales de aislamiento térmico y sonoro, producción de materiales ligeros en el área automotriz, materiales utilizados en la industria de construcción, y materiales absorbentes en instalaciones médicas (Negrell et al., 2016).

3.7. RESINAS EPOXICAS

Las resinas epoxi son polímeros que en su composición molecular poseen dos o más grupos epoxi (oxirano). Los grupos epoxi poseen un átomo de oxígeno enlazado a dos átomos de carbono.

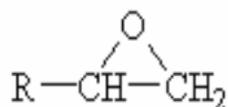


Figura 6. Estructura general del grupo epoxi.

Los productos derivados del grupo epoxi, considerados como los compuestos termoestables más relevantes en la actualidad, son ampliamente utilizados en los sectores aeronáuticos, automovilísticos, materiales reforzados en el área constructora, adhesivos de ingeniería, revestimientos, pinturas y artefactos electrónicos (Gimenez, 2005).

En la actualidad la producción de resinas epóxicas está siendo impulsada debido al crecimiento en el mercado mundial de la industria automotriz, electrónica, pintura y adhesivos. El valor del mercado alcanzó los 25.800 millones de dólares en 2018 y se estima que aumentará hasta los 33.600 millones de dólares en 2022 (Acmite Market Intelligence, 2018).

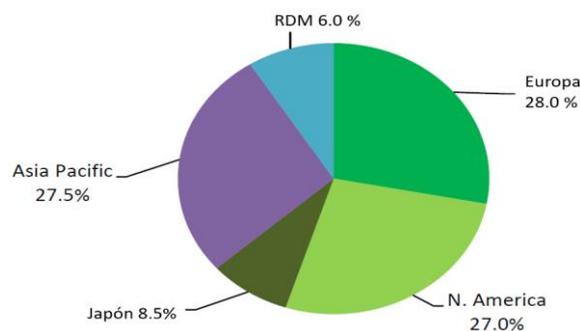


Figura 7. Demanda de resina epoxi por zona a nivel global.

3.8. RESINAS EPOXICAS BIOBASADAS

Las resinas epóxicas biobasadas son materiales sintéticos que se elaboran sustituyendo parcial o totalmente los compuestos tradicionales de una resina de base fósil por compuestos con propiedades similares, basados en materias primas renovables. En la actualidad, los monómeros de base biológica más utilizados corresponden a los aceites vegetales epoxidados y el cardanol (Negrell et al., 2016). Sin embargo, los aceites obtenidos de las microalgas podrían ser una alternativa tentadora respecto a los reactivos mencionados de forma anterior, esto se debe a que la mayor parte de la fracción lipídica de las cepas microalgales de agua dulce contiene ácidos grasos como el palmítico (C16:0), el palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1) y eicosapentaenoico (C20:5n3), los cuales representan alrededor del 63-80% de su fracción lipídica (Tejeda et al., 2015).

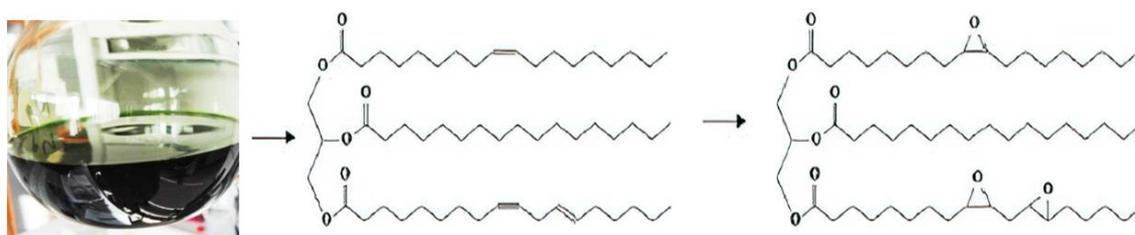


Figura 8. Comparación entre la estructura química de una red de ácidos grasos poliinsaturados respecto a la estructura del mismo ácido graso, pero epoxidado.

Diversos estudios concluyen que la obtención de materia prima para producción de ácidos grasos epoxidados utilizando microalgas, a diferencia de los monómeros tradicionales, tienen las siguientes ventajas (Hidalgo, Navia, Hunter, Gonzalez, & Echeverria, 2019):

- Para su producción, se utiliza una menor cantidad de terreno a diferencia de los cultivos terrestres, los cuales requieran una gran cantidad de superficie para su desarrollo (plantaciones).
- No se pierde materia prima destinada a la nutrición humana a diferencia de los ácidos grasos obtenidos mediante cultivos de palma, soya o linaza.
- Las redes de poliepóxidos obtenidas mediante biomasa microalgal son más estables respecto a las que se obtienen mediante los aceites vegetales. Esto se deba su mayor contenido de insaturación en su aceite, lo que deriva a una mayor reactividad (Negrell et al., 2016).

Debido a la evidencia científica presentada se podría demostrar la factibilidad en la obtención de ácidos grasos insaturados, como materia prima para la elaboración de ácidos grasos epoxidados. Esta materia prima es obtenida mediante la maduración de biomasa microalgal utilizada para la depuración de aguas contaminadas en sistemas de recirculación acuícola. El atractivo principal de esta propuesta se basa en la reutilización de esta biomasa sin ningún valor comercial en la generación de productos base, para la fabricación de polímeros biobasados.

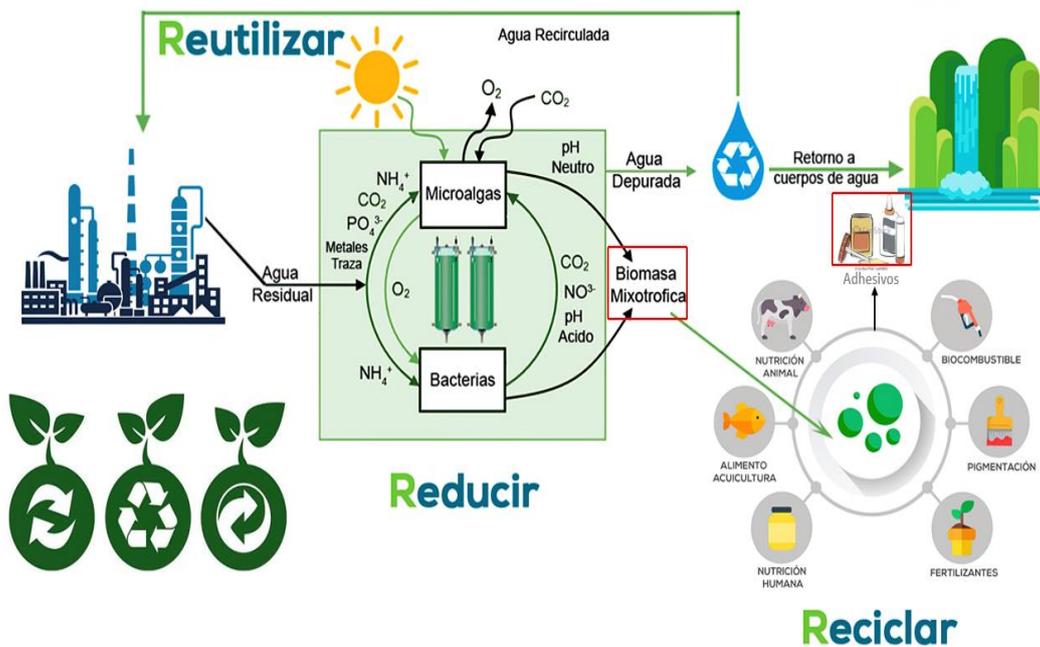


Figura 9. Esquema general del sistema de filtración FDM y sus posibles subproductos derivados de la biomasa microalgal.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la reutilización de la biomasa microalgal *Tetrademus obliquus*, obtenida en el sistema de recirculación acuícola, para la producción de ácidos grasos insaturados empleados en la fabricación de resinas epóxicas.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener biomasa microalgal desde un sistema de recirculación acuícola, evaluando los parámetros de cultivo en el fotobiorreactor.
- Evaluar el efecto salino e inanición sobre el perfil lipídico de la biomasa microalgal *Tetrademus obliquus*.

5. METODOLOGÍA

5.1. RECURSOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Fotómetro multiparamétrico HANNA y los correspondientes reactivos para medir amonio, nitrito, nitrato y fosfato.
- Espectrofotómetro Biotek Epoch.
- Micropipetas de 5mL, 1mL, 200 uL, 20 uL y 10uL con las cuales se colocan las muestras y los reactivos.
- Puntas desechables para cada micropipeta disponible.
- Placas multipocillos (96 pocillos de 350 ul cada uno).
- Placa Take 3.
- Software del equipo Epoch.
- Blower para aireación del sistema RAS.
- Overoles.
- Botas para el agua.
- pHmetro HANNA.
- Oxímetro HANNA.
- Sistema de cultivo RAS (12 piscinas de 300L, acumulador de aire, filtro bacteriano, biofiltro mixotrofico).
- Sistema de esferificación FDM.
- Sensor de temperatura (HANNA Instruments).
- Embudo de decantación.
- Biomasa seca de microalga T.O.
- Cloruro de sodio USP.
- Fosfato Monopotasio USP.
- Probeta de 1(L).
- Recipientes de plástico de 15 L.
- 9 matraces de 500 mL de capacidad.
- Mangueras de silicona de 5 mm.
- Aireador y Difusores de acuario.
- Foco led de 30W.
- Fotobiorreactor de columna de burbujeo.
- Alginato de sodio.
- Cloruro de amonio

5.2. PROCEDIMIENTO OBJETIVO ESPECIFICO 1

La siguiente metodología presenta las actividades que se realizaron para llevar a cabo el objetivo específico número 1. Las actividades contempladas para desarrollar este objetivo van desde el acondicionamiento del sistema de recirculación acuícola hasta la obtención de la biomasa microalgal. El crecimiento, maduración y obtención de esta biomasa se desarrolló en las instalaciones de la Piscicultura “Pangue”, ubicada en el Km 21, camino a Bulnes, 8va región.

5.3. ACONDICIONAMIENTO DEL SISTEMA DE RECIRCULACION ACUICOLA (RAS)

El acondicionamiento del sistema de recirculación acuícola inicia con el transporte de los fotobiorreactores y el sistema de siembra. Los equipos mencionados se trasladaron, utilizando un camión $\frac{3}{4}$, desde las instalaciones de la empresa FDM, ubicada en Aurelio manzano 594, Concepción, hasta la piscicultura de Pangue, ubicada en el Km 21, camino a Bulnes.



Figura 10. Sistema de fotobiorreactores montado en el vehículo de transporte.

El sistema hidráulico de los fotobiorreactores, el cual contiene tuberías y uniones de PVC, fue desmontado y extraído del vehículo hacia las instalaciones de la piscicultura de Pangue. Las bombas centrifugas utilizadas en el sistema hidráulico ya se encontraban en las instalaciones en Pangue.



Figura 11. Desmontaje del sistema de fotobiorreactores.

Los fotobiorreactores en conjunto con su sistema hidráulico fueron conectados a 3 líneas independientes, cada línea está constituida por 3 piscinas para peces configuradas en paralelo para cada fotobiorreactor.

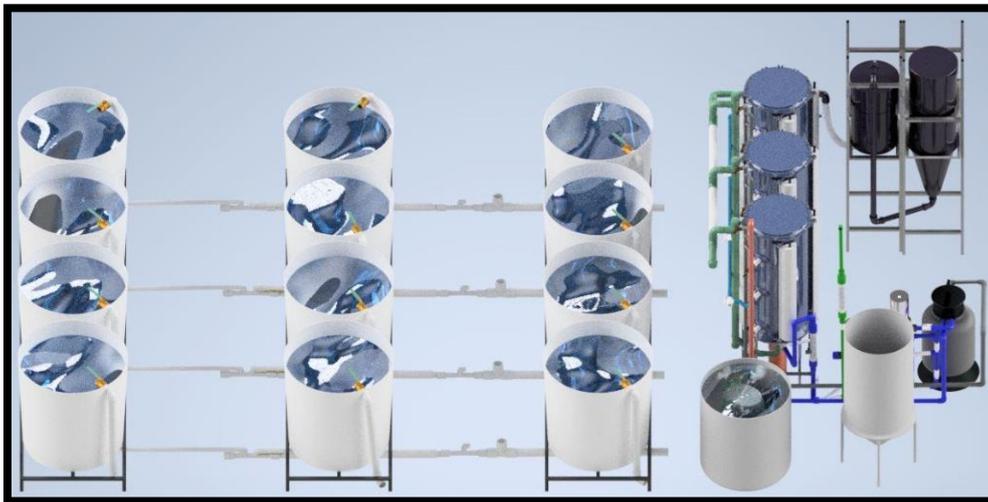


Figura 12. Sistema de recirculación acuícola (RAS) de la piscicultura de Pangue modelado en 3D.

El compresor de aire se conectó a un riel de aireación común para los 3 fotobiorreactores en su parte inferior. El filtro mecánico, el cual consiste en un sistema de filtración de anillas y arena, fue instalado en la parte posterior de los fotobiorreactores para luego ser conectado al sistema hidráulico principal mediante conexiones de PVC.

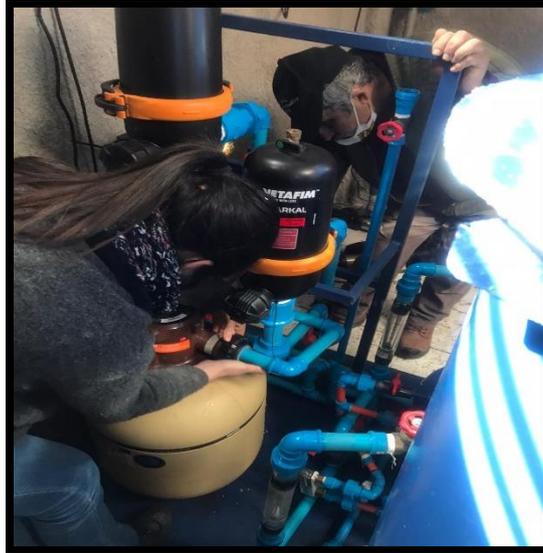


Figura 13. Montaje del sistema de filtración mecánica.

El sistema de iluminación fue instalado conectando 4 tubos led, de 18W de potencia a una temperatura de color de 6500K, en serie. Cada tubo led fue inmovilizado en un soporte curvo, 4 en total, para luego ser ensamblado en el fotobiorreactor en sus 4 extremos.

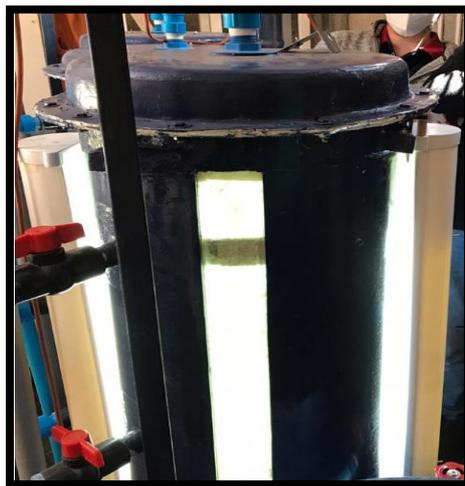


Figura 14. Sistema de iluminación montado en el fotobiorreactor.

Se realizaron pruebas hidráulicas de forma simultánea con el sistema de aireación para verificar el correcto funcionamiento del sistema. Los resultados de las pruebas determinaron dos problemas principales.

- Sobre presión de aire en el sistema, por el mal diseño del tubo de subida “Riser”, en el fotobiorreactor.

- Acumulación de esferas en la tubería de salida del fotobiorreactor debido a un sistema de retención ineficiente.

Los fotobiorreactores se modificaron removiendo el tubo de subida, “Riser” que contenía en su interior. Además, se modificó el sistema de retención de esferas, utilizando una malla con un área similar a la de la tapa del reactor, asegurando el flujo continuo de agua hacia el sistema.

5.4. CULTIVO DEL BIOMEDIO MIXOTROFICO

Cultivo Microalgal

Las microalgas utilizadas fueron cultivadas en un biorreactor por lote con una capacidad nominal de 160 (L), en el cual las microalgas fueron alimentadas de forma sintética mediante un fertilizante comercial.



Figura 15. Cultivo microalgal en el biorreactor por lote.

El medio de cultivo se mantuvo en un rango de temperatura entre 10°C y 13°C. Se realizaron mediciones de absorbancia a 680 nm todos los días hasta obtener un valor de absorbancia de 1,2 a 680 nm el día 7. El sistema de aireación, para este biorreactor, se detuvo con la finalidad de que la biomasa decantara durante el día. Al día siguiente se extrajo la mayor cantidad de agua del biorreactor. La biomasa concentrada fue extraída y recolectada por la parte inferior del biorreactor.

Para determinar la concentración inicial de biomasa se utilizó la relación entre absorbancia v/s concentración microalgal (mg/L) obtenidos a partir de datos experimentales realizados durante el estudio de (Quiñones, 2018).

$$\text{Absorbancia } (y) = 0,00027 * \text{Concentracion microalgal } (x)$$

Cultivo bacteriano

Las bacterias fueron cultivadas en un reactor de 160 (L) utilizando 2000 soportes de plástico, con la finalidad de que las bacterias se fijen y puedan absorber los nutrientes del agua residual. El cultivo bacteriano fue alimentado de forma mixta, esto consistió en periodos de utilización de peces en la línea y mediante la utilización sustrato artificial (NH_4Cl).



Figura 16. Cultivo bacteriano en el biorreactor por lote.

Preparación del biomedio

El biomedio se preparó mezclando 150 gramos de alginato de sodio en polvo, 8 (L) de cultivo de biomasa microalgal y 2 (L) de cultivo biomasa bacteriana, en un recipiente de volumen aproximado de 15 (L). La solución resultante fue homogenizada mediante agitación mecánica a 2800 RPM durante 30 minutos, tiempo en el cual se observó que la mezcla se encontrara completamente homogénea.

Inmovilización del biomedio

Se preparo una solución de cloruro de calcio, mezclando 200 gramos de $CaCl_2$ en 10 (L) de agua destilada. El recipiente que contiene esta solución se ubicó en la parte inferior del sistema de cosecha.

El biomedio preparado de forma anterior se dejó caer mediante goteo utilizando el sistema de siembra, las gotas de la solución del biomedio se esterificaban de forma inmediata debido a la reacción que se genera entre la solución de $CaCl_2$ y el alginato, decantando en la parte inferior del recipiente.

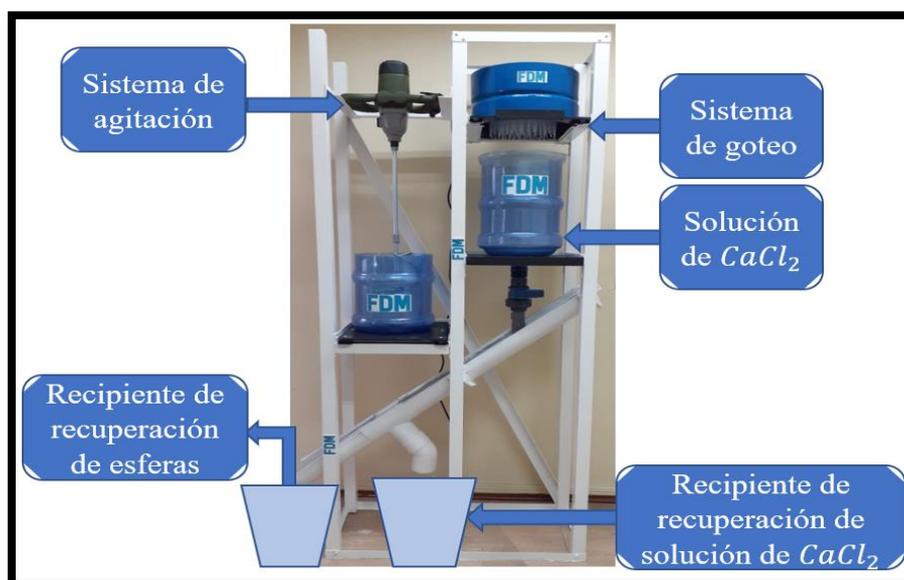


Figura 17. Sistema de cosecha y sus componentes.

5.5. MADURACION DEL BIOMEDIO EN EL FOTOBIORREACTOR

El biomedio inmovilizado en esferas se introdujo en el fotobiorreactor conectado en la línea 2. De forma posterior, se acciono el sistema hidráulico del sistema durante 30 minutos con la finalidad de comprobar su correcto funcionamiento. Luego de comprobar que el sistema funcionaba de forma adecuada, se ingresaron 10 peces (truchas) del tipo pinto en cada piscina de la línea.

Durante el periodo de maduración de la biomasa se midieron todos los días los parámetros de concentración de fosfato, amonio y nitrato, tomando una muestra en el agua de la línea, mediante el uso de un fotómetro multiparamétrico.

Los parámetros de pH y el oxígeno disuelto fueron medidos mediante un pHímetro y un oxímetro a la misma hora de la toma de concentraciones de compuestos orgánicos.

En el día 8, desde el ingreso de los biomedios al fotobiorreactor, se observó la ruptura parcial de las esferas, dando inicio al comienzo de exudación. Se procedió a detener el sistema y remover a los peces de las piscinas.

La biomasa (esferas) exudada fue recolectada de forma manual mediante el uso de coladores similares a una malla para peces. Esta biomasa fue almacenada y enviada a las instalaciones de la empresa FDM en Concepción.

5.6. PROCEDIMIENTO OBJETIVO ESPECIFICO 2

La siguiente metodología presenta las actividades que se realizaron para llevar a cabo el objetivo específico 2. Estas actividades contemplan la preparación, experimentación y el análisis de los tratamientos inducidos en las microalgas en el laboratorio de bioprocesos de la empresa Ingeniería y Bionegocios FDM, ubicada en Aurelio Manzano 594, Concepción. El método de análisis se basó en un experimento comparativo simple, diseñado para evaluar el efecto de los factores salinidad (NaCl) y la adición de un compuesto fosfatado (KH_2PO_4) sobre el perfil de ácidos grasos de la microalga *T. obliquus*.

5.7. REUTILIZACION DE BIOMASA BAJO CONDICIONES DE ESTRES

Las esferas exudadas fueron filtradas utilizando un colador convencional para remover el máximo volumen de agua posible. El volumen de la biomasa (esferas exudadas) fue medido utilizando una probeta de 1 (L) en donde se utilizaron 900 mL de biomasa, repartido en tres matraces, para cada tratamiento.

Preparación de las condiciones de experimentación

El experimento contemplo un sistema de iluminación constituido por un reflector de luz led, de 30W de potencia a una temperatura de color de 6500K, a una altura aproximada de 100 cm respecto a la superficie que soportaba los matraces.

El sistema de agitación estaba constituido por un tren de aireación, el cual consta de 9 salidas. Para cada salida se conectó una manguera de silicona con un diámetro interior de 5 mm, junto a su difusor correspondiente. Cada conjunto de manguera y difusor fueron introducidos de forma individual en cada matraz.



Figura 18. Fotografía del sistema experimental ya instalado.

Tratamientos

Nueve matraces de 500 (mL) de capacidad fueron colocados en la siguiente disposición:



Figura 19. Esquema y nomenclatura de los matraces en la experimentación.

Para el tratamiento 1 fueron depositados 300 mL de biomasa para cada matraz en la fila 1 (M1, M2 y M3). Luego, se añadió agua destilada hasta obtener un volumen total de 400 mL en cada matraz.

Para el tratamiento 2 se pesó una cantidad de 2,35 gramos de cloruro de sodio (NaCl), por triplicado, el cual fue depositado en el matraz M4, M5 y M6. Luego, fueron depositados 300 mL de biomasa para cada matraz en la fila 2 (M4, M5 y M6) y se añadió agua destilada hasta obtener un volumen total de 400 mL en cada matraz.

Para el tratamiento 3 se pesó una cantidad de 2,35 gramos de cloruro de sodio (NaCl) y una cantidad de 0,0062 gramos de KH_2PO_4 , por triplicado, para luego ser depositados en el matraz M7, M8 y M9. Luego, se depositaron 300 mL de biomasa para cada matraz en la fila 3 (M7, M8 y M9) y se añadió agua destilada hasta obtener un volumen total de 400 mL en cada matraz.

5.8. RECOLECCION DE BIOMASA TRATADA

La biomasa, para cada tratamiento, fue recolectada mediante filtración. Se utilizó un colador para retener la biomasa para cada tratamiento.

La biomasa total por tratamiento (3 matraces) fue depositada en recipientes de aluminio, previamente rootulados con el número del tratamiento correspondiente.

Las muestras se ingresaron a un calefactor de laboratorio, operando a una temperatura de 80°C, en donde se secaron luego de transcurrir dos días.

La biomasa, separada por cada tratamiento, fue depositada en tubos graduados de 15 mL, para luego ser enviada a la empresa INOCONN S.A. En estas instalaciones, se realizó la extracción de ácidos grasos y el análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) midiendo la cantidad y tipo de ácido graso para cada tratamiento.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención de biomasa microalgal desde un sistema de recirculación acuícola, evaluando los parámetros de cultivo en el fotobiorreactor.

6.1.1. Determinación de compuestos de amonio, nitrito y fosfato en el sistema RAS.

Los siguientes resultados se obtuvieron mediante fotometría. Se utilizó un fotómetro multiparamétrico en conjunto con sus reactivos correspondientes para la medición de amonio, nitrito y fosfato.

Tabla 2. Concentración de amonio, nitrito y fosfato obtenidas en las muestras de agua del fotobiorreactor.

Día	Amonio (mg/L)	Nitrito (mg/L)	Fosfato (mg/L)
1	3,86	0	0
2	3,3	0	7,7
3	1,7	0,219	1,04
4	4,2	0,323	2,4
5	10,37	0,511	3,7
6	9,41	0,954	4,6
7	11,09	1,06	3,9
8	9,52	5,37	4,9

Comportamiento del fosfato (PO_4^{3-})

El aumento de la concentración de fosfato entre el primer y segundo día se debió al exceso de alimentos de las peces ingresadas al sistema. Desde el cuarto día se puede observar un pequeño aumento en la concentración de este parámetro respecto al día anterior, hasta llegar a un equilibrio entre el día 6 y 8. De esto se puede inferir que la microalga está absorbiendo este nutriente de forma estable.

Comportamiento del Amonio (NH_4^+)

La concentración de amonio presente en el primer día se debe a que esta sustancia ya se encontraba incorporada en el agua utilizada para el sistema RAS (Aguas fluviales).

Del día 3 al día 5 se observa un aumento considerable en la concentración de amonio hasta llegar a un equilibrio desde ese día, hasta el final de la experimentación, obteniendo una concentración de amonio aproximada entre los 9 mg/L hasta los 11 mg/L.

Comportamiento del Nitrito (NO_2^-)

El aumento de la concentración de nitrito puede haber sido generado debido que la cantidad de bacterias del género *Nitrobacter* eran insuficientes para metabolizar la cantidad de nitrato generadas por las bacterias del género *Nitrosomas*.

Determinación de parámetros ambientales en el sistema RAS

Los siguientes resultados se obtuvieron mediante dos equipos analíticos. Se utilizó un pHímetro y un oxímetro, ambos con termómetro integrado.

Tabla 3. Concentración de oxígeno disuelto, valor de pH y temperatura obtenidas en las muestras de agua del fotobiorreactor.

Día	O ₂ (mg/L)	pH	Temperatura (°C)
1	11,9	8	12,8
2	12,8	7,8	11,9
3	10,73	6,97	10,1
4	11,4	8,85	7,15
5	9,94	8,1	6,9
6	9,68	8,15	8
7	8,22	8,18	8,4
8	5,85	7,36	7,6

Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto se mantuvo en un rango acotado entre los 9 a 12 mg/L durante los primeros 6 días, desde la puesta en marcha del fotobiorreactor (día 1). La rápida disminución de este valor entre el día 7 y 8 se debió al mal funcionamiento del compresor de aire, el cual tuvo que ser reemplazado el mismo día que se cosechó la biomasa microalgal. Esta perturbación pudo haber incidido de forma directa en el metabolismo aeróbico microbiano y en la correcta respiración celular de los peces, liberando una menor cantidad de dióxido de carbono, el cual impacta de forma directa en el metabolismo microalgal.

pH

El pH se mantuvo en un rango aproximado entre 7 a 9. Saavedra, (2020) informa que en cultivos microalgales sanos el nivel de pH tiende a subir debido al consumo de carbono

y la actividad fotosintética del microorganismo. Esto se traduce en la liberación de grupos OH^- , el cual se comporta como un componente basificante del medio

Temperatura

La temperatura del medio fue disminuyendo al transcurrir los días, teniendo el valor más bajo el día 5. Este factor, descrito anteriormente por Benavente-Valdés et al., (2021) puede haber influido de forma relevante en el crecimiento y la tasa de depuración de fosfato en la microalga. Esto se debe a que la temperatura impacta de forma directa el metabolismo del microorganismo, ralentizando sus funciones metabólicas a medida que esta va disminuyendo.

Determinación teórica del crecimiento microalgal.

Los siguientes resultados se obtuvieron relacionando la absorbancia respecto a la concentración de biomasa microalgal de la figura 16 (Quiñones, 2018). Se estableció un factor de conversión (x10) debido a que la medición de absorbancia obtenida se realizó con el reactor operando a 100 (L). Luego de que se dejara decantar la biomasa del reactor, se extrajo casi el 90% del agua total, obteniendo un volumen de biomasa concentrado de 10 (L).

Tabla 4. Concentración de la biomasa microalgal y su relación con la absorbancia cuantificada a 680 nm.

Día	Absorbancia a 680 nm	Concentración (mg/L) de biomasa en suspensión	Concentración (mg/L) en biomasa decantada	Concentración final (g/L)
1	0,468	173,33	1733,3	1,73
2	0,481	178,15	1781,5	1,78
3	0,58	214,81	2148,1	2,15
4	0,639	236,67	2366,7	2,37
5	0,655	242,59	2425,9	2,43
6	1,052	389,63	3896,3	3,90
7	1,205	446,3	4463	4,46

De forma teórica, la concentración inicial de la biomasa microalgal extraída en el biorreactor “batch” es de 4,46 g/L. Debido a esta relación se obtiene un valor de 4,014 g

de biomasa para 900 mL, volumen utilizado para los tratamientos en condiciones de estrés en el laboratorio.

Tabla 5. Cantidad de masa seca de la biomasa microalgal obtenida para cada tratamiento bajo condiciones de estrés.

Muestra	Peso seco total (g)	Peso seco microalgal (g) (80 % del total)
Tratamiento control	6,16	4,93
Tratamiento 1	6,39	5,11
Tratamiento 2	6,42	5,14
Promedio	6,32	5,06

Tomando en cuenta de forma teórica que el 80% de esta biomasa es de microalga, y asumiendo un promedio del 80% de este valor entre las 3 biomاسas (5.05 g), se puede calcular un aumento teórico del **25,80%** de la biomasa microalgal. Este aumento se basa tomando como valor inicial la concentración de salida del reactor por lotes (4,01 g) hasta la finalización de los tratamientos de estrés post cultivo en el laboratorio.

6.2. Estudio del efecto de agentes estresantes sobre el perfil lipídico de la biomasa microalgal *Tetrademus obliquus*

Los siguientes resultados corresponden al perfil lipídico de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) llevado a cabo por la empresa INOCONN S.A. La nomenclatura para los tratamientos corresponde a:

- Tratamiento C. (control): Biomasa obtenida y suspendida en agua destilada.
- Tratamiento 2: Biomasa obtenida y suspendida en agua destilada en presencia de NaCl (0.1M).
- Tratamiento 3: Biomasa obtenida y suspendida en agua destilada en presencia de NaCl (0.1M) y KH_2PO_4 (115 μ M).

Perfil lipídico de la microalga *T. Obliquus*.

Tabla 6. Indica el tipo y la cantidad de ácidos grasos saturados para cada muestra, incluido los no identificados.

Ácido Graso	Nombre	Tratamiento C.		Tratamiento 2		Tratamiento 3	
		(%)	AG g/100g	(%)	AG g/100g	(%)	AG g/100g
C14:0	Mirístico	2,82	0,99	1,51	0,38	2,33	0,64
C15:0	Pentadecanoico	0	0	0,32	0,08	0,35	0,09
C16:0	Palmitico	17,94	6,16	14,19	3,52	14,91	4,03
C17:0	Heptadecanoico	0	0	0	0	0,16	0,04
C18:0	Estarico	3,46	1,17	1,73	0,42	1,92	0,51
C21:0	Henicosanoico	0,55	0,18	0,25	0,06	0,21	0,05
C22:0	Bahenico	0	0	0,31	0,07	0,23	0,06
Total, ácidos grasos saturados		24,77	8,5	18,3	4,54	20,11	5,44
Total, OMEGA 3		15,2	4,99	17,3	4,14	18,5	4,81
Total, no identificado		29,92		37,05		31,97	

La cantidad porcentual de ácidos grasos saturados para la microalga *T. obliquus* disminuyo en un 26,12% en el tratamiento 2 y en un 18,81% en el tratamiento 3 respecto al tratamiento control. Salem, (2013) informa el mismo fenómeno para la cepa *Chlorella vulgaris*, reportando una disminución porcentual en la cantidad de AGS de un **34,3%** bajo las mismas condiciones de estrés salino (0.1M) usados en este trabajo.

El tratamiento control obtuvo la mayor cantidad porcentual de ácidos grasos saturados, de un 24,77 % respecto al total porcentual de ácidos grasos de la biomasa microalgal.

El ácido graso Palmítico, para todos los tratamientos supera el 70% de la composición total de ácidos grasos saturados para la microalga *T. obliquus*, correspondiendo a un 72% para el tratamiento 1, un 82% para el tratamiento 2 y un 81% para el tratamiento 3, respecto al porcentaje total de ácidos grasos saturados para cada tratamiento.

Tabla 7. Indica el tipo y la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados para cada muestra, incluido los no identificados, la cantidad de EPA y DHA que contienen y el total de OMEGA 6.

Ácido Graso	Nombre	Tratamiento C.		Tratamiento 2		Tratamiento 3	
		(%)	AG g/100g	(%)	AG g/100g	(%)	AG g/100g
C14:1	Miristoleico	0	0	0,25	0,06	0,18	0,05
C16:1	Palmitoleico	3,02	1,03	2,78	0,68	3,92	1,05
C17:1	cis-10-Heptadecenoico	0	0	0,61	0,15	1	0,27
C:18:1n9(c+t)	Oleico+Elaidico	15,2	5,11	11,1	2,7	10,99	2,91
C18:1n7	cis-11-Octadecanoico	3,27	1,1	5,47	1,33	5,07	1,34
C20:1n9	cis-11-Eicoseinoico	0,78	0,26	0,35	0,08	0,47	0,12
C22:1n11	cis-13-Docosenoico	0	0	0	0	0,25	0,07
C22:1n9	Eurico	1,31	0,43	0,8	0,19	0,89	0,23
Total, ácidos grasos monoinsaturados		23,6	7,93	21,4	5,21	22,77	6,04
EPA + DHA		4,65	1,5	0,37	0,09	2,25	0,57
Total, OMEGA 6		5,87	1,95	5,8	1,39	5,47	1,43

La cantidad porcentual de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) para la microalga *T. obliquus* disminuyó en todos los tratamientos respecto al porcentaje total de AGM del tratamiento control. El tratamiento número 3 generó la menor disminución de AGM en un 3,51%, por otra parte, el tratamiento número 2 generó la mayor disminución porcentual, un 9,32 %, ambos porcentajes respecto al tratamiento control en el total de AGM. Para todos los tratamientos, el porcentaje total más alto en la composición de AGM corresponde al ácido Oleico+Elaidico, conteniendo un 64 % para el tratamiento control, un 52 % para el tratamiento 2 y un 48% para el tratamiento 3, respecto al total de AGP para cada tratamiento.

Tabla 8. Indica el tipo y la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados para cada muestra, incluido los isómeros del EPA, DHA, DPA y el total de ácidos grasos poliinsaturados en cada muestra.

Ácido Graso	Nombre	Trat. control		Tratamiento 2		Tratamiento 3	
		(%)	AG g/100 g	(%)	AG g/100g	(%)	AG g/100g
C16:2n4	cis-9,12-Hexadecadienoico	0	0	0	0	0,18	0,05
C16:3n4	cis-9,12,15-Hexadecatrienoico	0	0	0,16	0,04	0,53	0,14
C16:4n1	cis-6,9,12,15-Hexadecatetraenoico	0,65	0,22	0	0	0,47	0,12
C18:2n6(c+t)	Linoleico+Linolelaídico	5,2	1,74	4,78	1,15	4,54	1,19
C18:3n6	γ -Linolenico	0	0	0,26	0,06	0,27	0,07
C18:3n3	α -Linolenico	9,14	3,03	15,07	3,61	14,23	3,71
C18:4n3	cis-6,9,12,15-Octadecatetraenoico	1,4	0,46	1,1	0,26	1,44	0,37
C20:3n3	cis-11,14,17-Eicosatrienoico	0	0	0,75	0,18	0,58	0,15
C20:4n6	Araquidónico	0,67	0,22	0,76	0,18	0,66	0,17
C20:5n3	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentanoico (EPA)	2,9	0,94	0,37	0,09	1,43	0,37
C22:6n3	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexanoico (DHA)	1,75	0,56	0	0	0,81	0,21
Total, ácidos grasos poliinsaturados		21,7	7,16	23,26	5,57	25,15	6,55

La cantidad porcentual de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) para la microalga *T. obliquus* aumento en todos los tratamientos respecto al tratamiento 1. El tratamiento 3 generó el máximo aumento porcentual, un 15,56% (21,7%-25,15%) respecto al tratamiento control en el total de ácidos grasos poliinsaturados. Dentro de lo AGP reportados en los resultados, el ácido graso α -Linoleico generó el mayor aumento en el tratamiento 2 (**64,87%**) y un aumento considerable en el tratamiento 3 (**55,68%**) respecto al porcentaje del tratamiento control. Este resultado concuerda con la investigación de Salama et al., (2013), el cual reporta que la microalga *S. obliquus* bajo un estrés salino a 25mM y 50 mM generó un aumento en el porcentaje de ácido α -linolénico (C18:3n3) de un **30%** y un **41 %** respecto a su control.

Los ácidos grasos Linoleico+Linoleáidico, los cuales corresponden al segundo ácido graso más abundante en la composición lipídica poliinsaturada de la microalga, disminuyeron en un 8,07 % para el tratamiento 2 y un 12,70 % en el tratamiento 3, respecto al porcentaje de este ácido graso en el tratamiento control.

El aumento en la acumulación de lípidos microalgales se prevé en condiciones particulares de estrés asumiendo un costo en el crecimiento de biomasa microalgal. La selección de condiciones de estrés adecuadas facilita una mejor productividad de lípidos disminuyendo en lo posible el impacto que genera este factor en la producción de biomasa (Singh Gour, Kumar Garlapati, & Anil, 2019).

En vista lo anterior, el perfil de ácidos grasos depende generalmente del estado fisiológico de las algas y del nivel de salinidad. Los cambios en el perfil de ácidos grasos en respuesta a una salinidad elevada en el medio son inevitables para mantener la membrana plasmática y evitar su destrucción. Diversos estudios se han centrado en describir las respuestas adaptativas que inducen algunos factores mencionados en el metabolismo microalgal. Suen, Hubbard, Holzer, & Tornabene, (1987) informaron que la asimilación de elementos de carbono y la fotosíntesis no se detiene bajo condiciones salinas, sin embargo, el patrón de síntesis de ácidos grasos se modifica generando un aumento en la síntesis y almacenamiento de triglicéridos (TAG) en el citoplasma en forma de gotas de aceite. Investigaciones similares, como la de Ji, et al., (2018) avalan lo anterior, concluyendo que los cambios en el contenido y perfil lipídico en las microalgas corresponden a un mecanismo de adaptación para hacer frente al aumento de la presión osmótica intracelular. Esto permite que la microalga mantenga la fluidez e integridad de la membrana plasmática bajo altas concentraciones de NaCl en el medio.

Por otra parte, Salem, (2013) concluye que la privación de nutrientes en el medio, como el fósforo y nitrógeno no son tolerados por todas las cepas microalgales. En su estudio, la cepa *Phormidium sp* no pudo generar un desarrollo óptimo en la producción de ácidos grasos bajo la privación completa de nitrógeno y fósforo. El fósforo es un componente esencial en el metabolismo lipídico microalgal, esto se ve reflejado en el presente estudio, ya que una cantidad reducida de fósforo en el medio puede impactar de forma significativa en la cantidad de ácidos grasos insaturados sintetizados en la microalga *T. Obliquus*.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. CONCLUSIONES

Del presente estudio se concluye que la biomasa microalgal de la cepa *Tetrademus obliquus* si puede ser reutilizada para la producción de ácidos grasos insaturados debido a que el porcentaje total de ácidos grasos poliinsaturados, altamente epoxidables, para el tratamiento inducido bajo salinidad (NaCl, 0.1M) en conjunto con una pequeña adición de fosfato monopotásico (KH_2PO_4 , 115 μ M) generó un aumento porcentual significativo (15,56%) respecto al tratamiento control. Sin embargo, la adición en pequeña proporción de compuestos que contengan nitrógeno podría aumentar la cantidad de ácidos grasos insaturados, este fenómeno dependerá de la tolerancia a la deficiencia total de nitrógeno de la microalga *T. obliquus* y el impacto económico que generaría la utilización de más recursos para la producción de esta materia prima.

7.2. RECOMENDACIONES

Del presente estudio se puede recomendar lo siguiente:

- Realizar la experimentación con un medio de cultivo base estandarizado.
- Estudiar qué factores de estrés, a parte de los utilizados en este estudio, que puedan maximizar la producción de ácidos grasos insaturados en la biomasa microalgal.
- Experimentar y determinar cuáles interacciones entre los posibles factores generan un cambio significativo positivo en la composición de ácidos grasos de las microalgas.
- Si la respuesta y cantidad de ácidos grasos insaturados obtenidos es significativa. Se recomienda escalar el proceso, utilizando los factores más influyentes, teniendo en cuenta que la producción de ácidos grasos insaturados debería ser tomada como una unidad productiva separada y específica para dicho propósito.

8. REFERENCIAS

- Acién, F., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G., Sepulveda, C., & Masojidek, J. (2013). Photobioreactors for the production of microalgae. *Environ Sci Biotechnol*, 131-151.
- Acmite Market Intelligence. (2018). *Global Epoxy Resin Market, Markets, Products, Applications, Innovation, Chances & risks, Competitions, Prospects to 2022*. Market Report.
- Alvarado, M. (2012). *Reactividad de a-cetoepoxidos frente a acetales de bis-(trimetilsilil)ceteno*. Mexico: Universidad nacional autónoma de México.
- Atiku, A., Mohamed, R., Al-Gheethi, A., Wurochekke, A., & Kassim, A. (2016). Harvesting microalgae biomass from the phycoremediation process of greywater. *Environ. Sci. Pollut.*, 24624-24641.
- Azrina Yaakob, M., & al, e. (2020). Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*.
- Barreiro, S. (2019). *Caracterización de los consorcios microalgas-bacterias en el tratamiento de agua residual urbana*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Benavente, R., Aguilar, C., Montañez, J., & Mendez, A. (2021). Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Researchgate*.
- Benavente-Valdés, J. R., Montañez, J., Aguilar, C., Mendez-Zavala, A., & Valdivia, B. (2021). Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*.
- Benavente-Valdés, R., & N Aguilar, C. (2012). Tecnología de Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactores. *Researchgate*.
- C Rustan, A., & A Drevon, C. (2005). Fatty Acids: Structures and Properties. *Researchgate*.
- C. Burdge, G., & C. Calder, P. (2015). Introduction to Fatty Acids and Lipids. *World Rev Nutr Diet. Basel*.
- C. Capricho, J., Fox, B., & Hameed, N. (2019). Multifunctionality in Epoxy Resins. *Polymer reviews*.
- Cajamar, Caja rural. (2016). Cultivo de microalgas a gran escala: Sistemas de producción. *ADNAgro*, 9-13.
- Carvajal, A. (2010). *Manual de nutrición y dietética*. Madrid: Departamento de nutrición, Universidad Complutense de Madrid.
- Coboz Ruiz, M., Paredes Rodríguez, J. D., & Castro Gómez, J. C. (2015). Induction of Total Lipids Production in Microalgae Under Nutritional Stress. *Acta biológica Colombiana*.
- CONICYT. (2015). *Ciencia y Tecnología para el Desarrollo de las Regiones: Avances y resultados de los Centros Regionales creados por CONICYT y los Gobiernos Regionales*. Santiago: Ideaconsultora Ltda.
- Consejo del Salmon. (2021). *Informe anual de Exportaciones de Salmon*. Chile.
- Consejo del salmón Chile. (2021). *Informe anual de exportaciones de salmon*.

- Doran, P. M. (1998). Acribia S.A.
 Editec. (2019). Catastro de acuicultura en Chile. *Aqua*.
 Editec. (2020). Industrias del Salmon, desafíos, medio ambiente y sustentabilidad. *Aqua*.
 Freddy Leonard, A. (2009). *El reciclaje de polimeros, alternativa para la sintesis de resinas epoxicas en la industria*. Facultad de ingeniería uniminuto.
 Fuentes, R., Del Sol, M., Veuthey, C., Vargas, C., & Ottone, N. (2018). Epoxy Sheet Plastination on a Rabbit Head – New Faster Protocol with biodur E12/E1. *Int.J.Morphol*, 441-446.
 Gimenez, B. (2005). *Coopolimerizacion de una resina epoxi con una espirobis lactona para obtener materiales termoestables con baja contraccion y potencialmente degradables*. Barcelona: Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona.
 Goldberg-Khozin, I., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *ELSEVIER*, 696-701.
 Hidalgo, P., Alvarez, S., & Hunter, R. (2020). Epoxidation of Fatty Acid Methyl Esters Derived from Algae Biomass to Develop Sustainable Bio-Based Epoxy Resins. *polymers*.
 Hidalgo, P., Navia, R., Hunter, R., Gonzalez, M., & Echeverria, A. (2019). Development of novel bio-based epoxides from microalgae *Nannochloropsis gaditana* lipids. *Elsevier*, 653-662.
 Jarpa, M. (2017). *Enriquecimiento de actividad nitrificante en sedimentos marinos mediante sistemas discontinuos*. Concepcion: Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile.
 Ji, X., Cheng, J., Gong, D., Zhao, X., Qi, Y., Su, Y., & Ma, W. (2018). The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002. *Elsevier*, 593-599.
 Jimenez, L. (2014). *Diseño conceptual de un reactor en fase gas-liquido para la produccion de bicarbonato de sodio*. Medellin: Universidad Eafit.
 Juarez, E. (2012). *Analisis y evaluacion de propiedades termicas y mecanicas de materiales resinicos del tipo Epoxi/Amina*. Saltillo: Centro de investigacion en quimica aplicada.
 Losordo M, T., Masser P, M., & James, R. (1998). Recirculating Aquaculture Tank Production Systems. *Southern Regional Aquaculture Center*, 451.
 Market, E. (2021). *Global Epoxy Resins Market to Grow at a CAGR of 5% over the Forecast Period of 2021-2026*. Obtenido de Global Epoxy Resins Market to Grow at a CAGR of 5% over the Forecast Period of 2021-2026.: <https://www.expertmarketresearch.com/reports/epoxy-resins-market>
 Masmela-Mendoza, J., Lizarazo-Forero, L., & Aranguren, N. (2019). Bacterias nitrificantes cultivables de la zona limnetica del lago de Tota Boyaca. *U.D.C.A Actualidad & Divulgacion cientifica*.
 Masser, M. P., & Losordo, T. (2006). Recirculating aquaculture tank production systems: Aquaponics-Integrating fish and plant culture. *ResearchGate*.

- Megias, M., Molist, P., & Pombal, M. (2017). *Membrana celular*. España: Departamento de biología funcional y ciencias de la salud.
- duction of Total Lipids Production in Microalgae Under Nutritional Stress. (2015). *Acta biológica Colombiana*.
- Negrell, C., Cornille, A., De Andrade, P., Jean Jaques, R., & Caillol, S. (2016). New biobased epoxy materials and foams from microalgal oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Norambuena, R., & González, L. (2021). *Visión general del sector acuícola nacional - Chile*. Chile: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO.
- Outlook, G. E. (2020). *Expertmarketresearch*. Obtenido de <https://www.expertmarketresearch.com/reports/epoxy-resins-market>
- Pereira da Silva, P., & Andre Ribeiro, L. (2019). Assessing Microalgae Sustainability as a Feedstock for Biofuels. *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts*.
- Petrovic, Z., Zlatanic, A., & Snezana, C. (2002). Epoxidation of soybean oil in toluene with peroxyacetic and peroxyformic acids – kinetics. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 293-299.
- Pique, T., & Vazquez, A. (2012). USO DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) EN EL ESTUDIO DE LA HIDRATACION DEL CEMENTO. *CONCRETO Y CEMENTO. INVESTIGACION Y DESARROLLO VOL 3*, 62-71.
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2013). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 1359-1377.
- Quiñones, J. (2018). *Tratamiento de aguas de acuicultura y producción de biomasa microalgal mediante fotobiorreactores*. Concepcion: Universidad de Concepcion.
- Raja, R., Shanmugam, H., & Ganesan, V. (2014). Biomass from Microalgae: An Overview. *Journal of Oceanography and Marine Research*.
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., & Minorsky, P. V. (2011). *Membrane structure and function*. San Francisco CA: Pearson: Campbell biology 10° ed, pag 127.
- Rodriguez, S. E. (2001). Biofiltros en Chile. *Aquaculture*, 4(32), 259.
- Saavedra, R. (2020). *Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO2*. Chile: FDM Biofilters.
- Salama, E.-S., Kim, H.-C., Abou-Shanab, R. A., Ji, M.-K., Oh, Y.-K., Kim, S.-H., & Jeon, B.-H. (2013). Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess Biosyst Eng*.
- Salem, O. M. (2013). Effect of nitrogen and phosphorus concentrations in growth medium and Salt stress on growth, lipid content, and biodiesel producing ability of microalgae. *ResearchGate*.

- Shetty, P., Mukami, M., & Gergely, M. (2019). Salinity Stress Responses and Adaptation Mechanism in Eularyotic green microalgae. *Cells*.
- Singh Gour, R., Kumar Garlapati, V., & Anil, K. (2019). Effect of Salinity Stress on Lipid Accumulation in *Scenedesmus* sp.: Feasibility of Stepwise Culturing. *Current Microbiology*.
- Skoog, & Holler, D. A. (2001). *Principios de analisis instrumental*. España: McGraw-Hill Interamericana.
- Specific Polymers. (27 de Marzo de 2019). *Bio-based epoxy resins*. Obtenido de <https://ecoxy.eu/news/bio-based-epoxy-resins/>
- Structural biochemistry/lipids/micelles (Bioquímica estructural/lípidos/micelas)*. (19 de Agosto de 2015). Obtenido de https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Lipids/Micelles
- Suen, Y., Hubbard, J., Holzer, G., & Tornabene, T. (1987). TOTAL LIPID PRODUCTION OF THE GREEN ALGA *LYA* *YOCHLOROPSIS* SP. QII UNDER DIFFERENT NITROGEN REGIMES. *Journal of Phycology*, 289-296.
- Tejeda, L., Henao, D., Alvear, M., & Rafael, C. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería*, 43-54.
- Vicente, S. (2019). *Diseño de un fotobiorreactor para la obtención de compuestos bioluminiscentes*. Barcelona: Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona.
- Wang, Y. (2016). Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. *Bioresource Technology*.
- Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L., & Zeng, C. (2001). Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (*Eustigmatophyta*). *Kluwer Academic Publishers*, 463-469.
- Yang, F., Xiang, W., Li, T., & Long, L. (2018). Transcriptome analysis for phosphorus starvation-induced lipid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Scientific Reports*, 1-11.
- Yang, L., Chen, J., Qin, S., Zeng, M., Jiang, Y., Hu, L., . . . Lei, A. (2018). Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*.

9. ANEXOS

9.1. PROTOCOLO DE EXTRACCION LIPIDICA MICROALGAL (TEORICO)

Se seleccionó el sistema de extracción por solvente, utilizando una mezcla de hexano/isopropanol (3:2 v/v). La selección de esta mezcla se realizó debido a que el sistema hexano/isopropanol es relativamente económico, fácil de recuperar después de la extracción y posee selectividad hacia los lípidos neutros, además la mezcla se considera segura a escala industrial, eficiente en la extracción de ácidos grasos y de baja toxicidad.

Procedimiento

La extracción de los lípidos se llevará a cabo en Matraces Erlenmeyer de 250 mL. La relación biomasa y solvente es de 1:3. Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Acidificación con H₂SO₄: se acidifica la biomasa (pH 3) con el fin de debilitar la pared celular de las microalgas, y así permitir la salida de compuestos lipídicos intracelulares.
2. Tiempo de reposo de media hora.
3. Autoclave: la biomasa acidificada se autoclava (5 min) con el fin de asegurar el proceso de destrucción celular.
4. Tiempo de reposo, 30 min.
5. Extracción lipídica: 20 g de pasta de microalga se agrega a la mezcla de solventes. Inmediatamente después se lleva a la incubadora por una hora a agitación constante.
 - Agitación a 200 rpm, para permitir la interacción entre el solvente y la microalga, y favorecer la migración del aceite desde el interior de la célula (*Danquah, et al., 2012*).
 - Temperatura 45°C para fomentar la solubilidad entre el solvente y el aceite (*Cravotto, et al., 2008*).
 - Porcentaje agua en el sistema del 20%, manteniendo el mismo porcentaje de agua del método de Bligh & Dyer (1959).
 - Tiempo de extracción de 1 hora.
6. Separación de fases: Se produce la separación de la fase orgánica y la fase acuosa, en un embudo de decantación.
7. Recuperación fase lipídica: Los lípidos se recuperaron evaporando el solvente a 60°C a presión atmosférica.

9.2. RELACION ABSORBANCIA RESPECTO A LA CONCENTRACION DE BIOMASA MICROALGAL

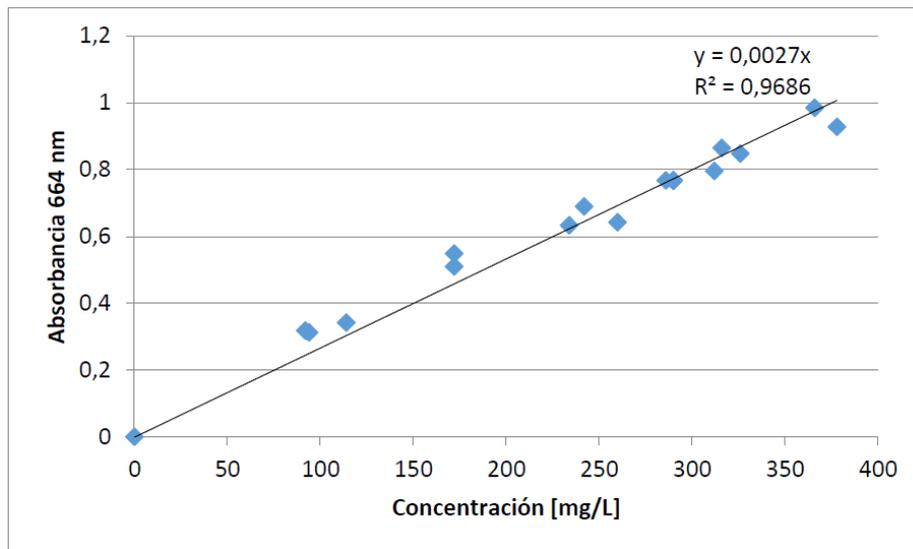


Figura 19. Relación entre la absorbancia y concentración de biomasa microalgal (mg/L) (Quiñones, 2018).

9.3. CURVA DE CALIBRACION DEL AMONIO

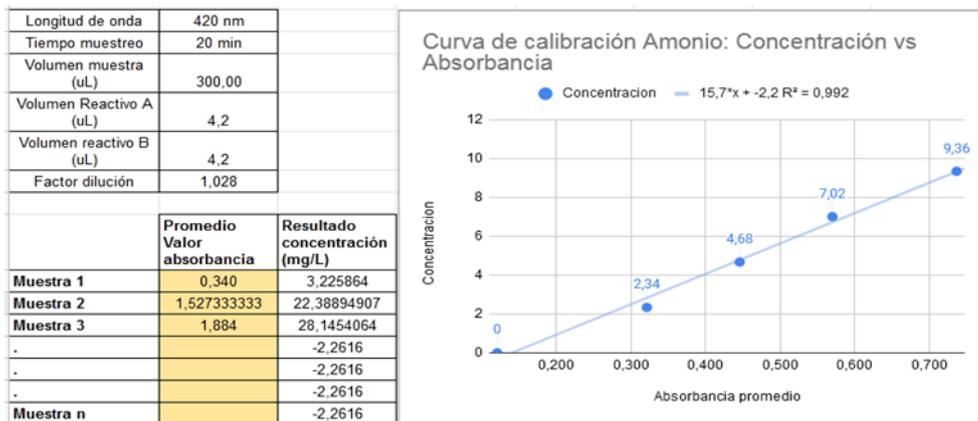


Figura 20. Curva de calibración para la medición de concentraciones de TAN (NH₄⁺, NH₃) en mg/L, volumen de muestras y reactivos (ejemplificación de uso de la tabla en amarillo).

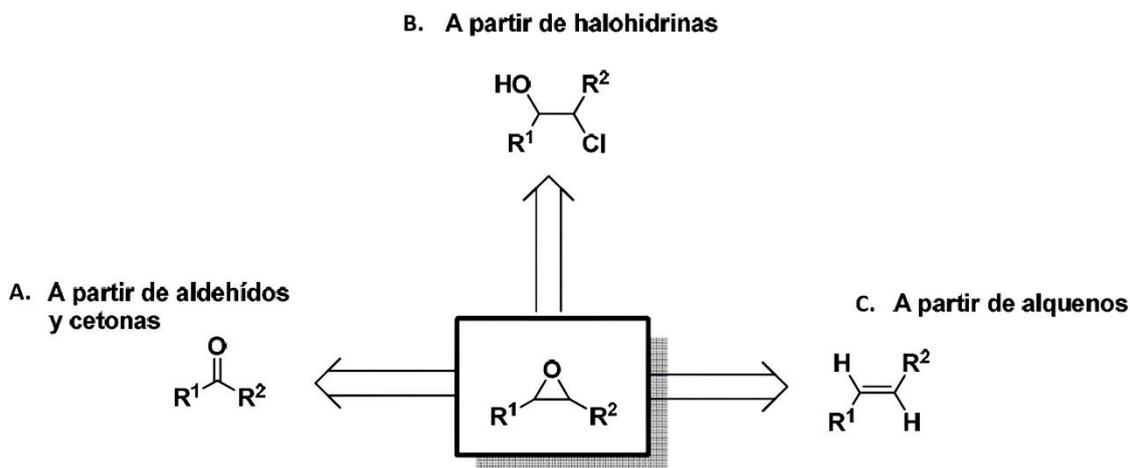


Figura 23. Esquema de los tres mecanismos más utilizados para la síntesis química de epóxidos en la actualidad.

La ruta **A** consiste en la transferencia de un equivalente de metileno a un grupo carbonilo. Las reacciones que pueden encontrarse de este tipo son la epoxidación de Darzens y Corey. La epoxidación de Darzens consiste en la formación de α,β -epoxiésteres (ésteres glicídicos) mediante una reacción de condensación que puede llevarse a cabo mediante el tratamiento de α -haloésteres con etóxido de sodio y la subsecuente adición nucleofílica a cetonas o aldehídos (Alvarado, 2012).



Figura 24. Epoxidación a base de ésteres glicídicos.

Por último, la epoxidación de Corey involucra la adición de iluros de azufre a cetonas y aldehídos para formar el correspondiente anillo de tres miembros. Esta reacción se lleva a cabo mediante el tratamiento de haluro de trialquilsulfonio con hidruro de sodio para formar el correspondiente metiluro de dimetilsulfonio, el cual se pone en contacto con un grupo carbonilo, favoreciendo la formación de epóxidos con isomería trans (Alvarado, 2012).

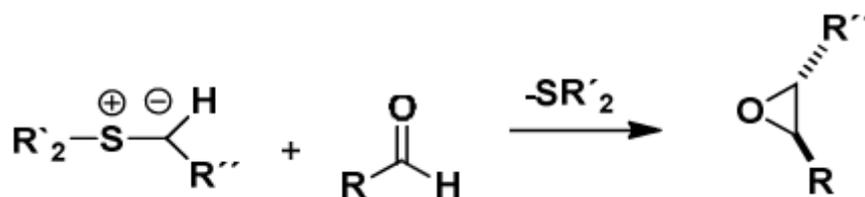


Figura 25. Epoxidación de Corey.

La ruta **B** consiste en la formación de oxiranos a partir de halohidrinás vía una variación a la síntesis de Williamson mediante el desplazamiento intramolecular de un grupo saliente por un alcóxido (Alvarado, 2012).

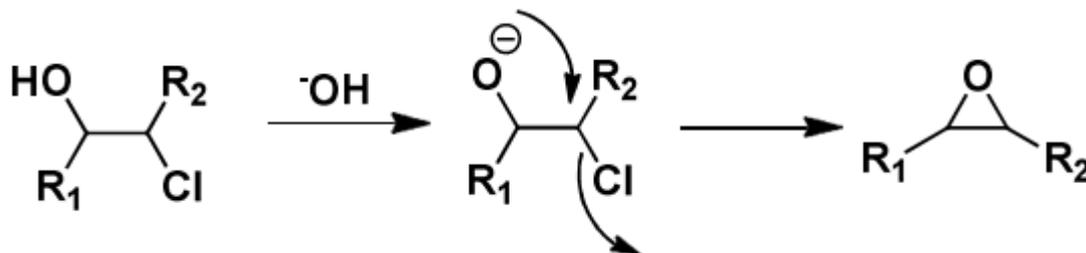


Figura 26. Epoxidación a partir de halohidrinás

La tercera ruta (**C**) es sin lugar a dudas la técnica más utilizada para la síntesis de epóxidos, que involucra la transferencia de un átomo de oxígeno a un doble enlace, esta puede llevarse a cabo mediante los métodos clásicos que consisten en tratar alquenos en medio básico en presencia de peróxido de hidrógeno,³ en el caso de olefinas deficientes en electrones o bien mediante el uso de un perácido cuando la olefina se encuentra rica en electrones (Alvarado, 2012).

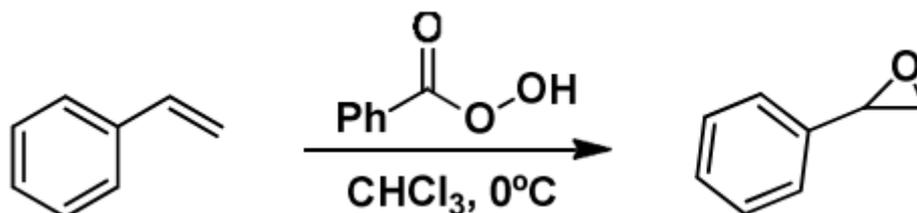


Figura 27. Epoxidación mediante sustitución nucleofílica.

Proceso de epoxidación de aceites vegetales y de microalgas

El proceso de epoxidación utilizado en los aceites vegetales y de microalgas corresponde a la ruta mencionada en el apartado anterior. Este se lleva a cabo mediante 2 reacciones químicas simultáneas, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 9. Reacciones químicas implicadas en la epoxidación de ácidos grasos insaturados.

Numero de la reacción	Abreviada	Estequiométrica
1	$AA + H_2O_2 \leftrightarrow PAA + H_2O$	$CH_3COOH + H_2O_2 \rightarrow CH_3CO_3H + H_2O$
2	$DB + PAA \leftrightarrow EO + AA$	$D.B + CH_3CO_3H \rightarrow E.O + CH_3COOH$

Donde:

- AA: Ácido acético o ácido fórmico
- PAA: Ácido peracético
- DB: Enlaces dobles
- EO: Grupo epoxico

La primera reacción es la formación catalizada de ácido peroxoacético (o peroxofórmico) a partir de ácido acético (o fórmico). Mientras que la segunda reacción corresponde a la epoxidación no catalizada de aceite insaturado con el peroxoácido, rompiendo los enlaces dobles de las cadenas de ácidos grasos insaturados, dando como producto un ácido graso con un grupo epoxi en su composición (Petrovic, Zlatanovic, & Snezana, 2002).

Parámetros de la epoxidación

Agitación:

La conversión de los doble enlaces y la formación de los grupos oxirano se ve aumentada con la velocidad de agitación. Los cambios de este parámetro son observables hasta las 1500 RPM, más allá de ese rango no se produce ningún cambio significativo en la cinética de la reacción. No obstante, este parámetro se deberá ajustar de tal forma que la mezcla de los componentes sea homogénea en todo el volumen del recipiente utilizado (Petrovic et al., 2002).

Relación molar H₂O₂/Instauración

La relación molar entre el peróxido de hidrogeno y la instauración promedio de los aceites está estrechamente relacionada con el rendimiento de la reacción. Relaciones entre 0.8 a 1.5 generan conversiones de los doble enlaces a grupos oxirano entre un 50% al 75% respectivamente. Valores más altos a 2.5 no se han considerado debido a que desde este punto el valor de la conversión del grupo oxirano suele disminuir debido a la aceleración de la descomposición del anillo oxirano (Petrovic et al., 2002).

Relación molar ácido acético-formico/instauración:

El ácido acético participa en la reacción en dos capacidades: primero, como catalizador en la formación del anillo de oxirano y, segundo, como reactivo en la hidrólisis del anillo de oxirano. Para alcanzar el máximo contenido de oxígeno del oxirano, el nivel de ácido acético debe ser tal que estos dos efectos se equilibren.

Estudios han demostrado que el aumento de la concentración de ácido acético utilizado para la generación de ácido peroxiacético no da lugar a un aumento proporcional en el rendimiento sobre la conversión de grupos oxirano. De los resultados obtenidos, valores en las relaciones de 0,5:1 en adelante no genera una mayor conversión, esto se ve reflejado al obtener un 72% de rendimiento en la epoxidación para una relación 0,65:1 como 0,5:1. Esto indica que la tasa de conversión no es directamente proporcional a la concentración de esta molécula (Petrovic et al., 2002).

Dependencia de la temperatura

Para la epoxidación se puede utilizar como reactivo ácido acético o ácido fórmico, para ambos casos la temperatura tiene un efecto favorable en la formación de ácido peroxiacético/peroxoformico, aumentando la velocidad de reacción y la conversión de los dobles enlaces en grupos epóxidos. Sin embargo, temperaturas más bajas disminuyen la velocidad de reacción, pero generan grupos oxirano más estables.

Estudios consideran que la temperatura óptima, teniendo un equilibrio entre la velocidad de reacción y el tiempo serían los 60°C para ambos reactivos. Sin embargo, se observa que el ácido peroxoformico obtuvo un contenido de epoxi algo mayor a 60 °C que a 80 °C (Petrovic et al., 2002).

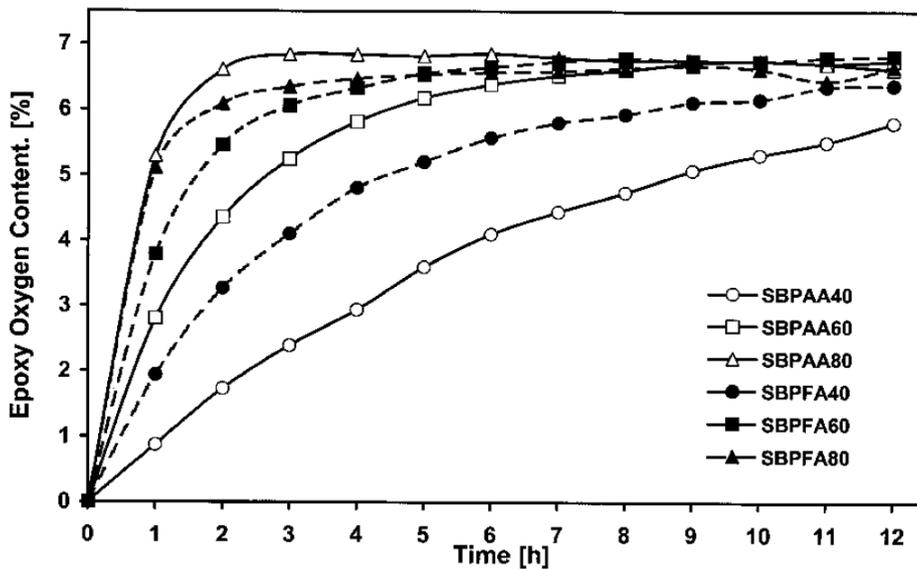


Figura 28. Comparación del contenido de oxígeno del grupo epoxi respecto al tiempo para la epoxidación del aceite de soja con ácido peroxoacético y peroxofórmico a diferentes temperaturas (Petrovic et al., 2002).