

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE INGENIERIA
CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA



PROYECTO DE GRADO

“Comparación de métodos de extracción de Beta-carotenos de microalgas nativas de la Laguna Colorada en medio natural y en fotobioreactores”

PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO QUIMICO

POSTULANTE: Univ. Axel Mauricio Yujra Iturralde

TUTOR: Ing. Santiago Morales Maldonado Ph.D.

LA PAZ-BOLIVIA

Junio, 2024



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE INGENIERIA**



LA FACULTAD DE INGENIERIA DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS AUTORIZA EL USO DE LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO SI LOS PROPÓSITOS SON ESTRICTAMENTE ACADÉMICOS.

LICENCIA DE USO

El usuario está autorizado a:

- a) Visualizar el documento mediante el uso de un ordenador o dispositivo móvil.
- b) Copiar, almacenar o imprimir si ha de ser de uso exclusivamente personal y privado.
- c) Copiar textualmente parte(s) de su contenido mencionando la fuente y/o haciendo la cita o referencia correspondiente en apego a las normas de redacción e investigación.

El usuario no puede publicar, distribuir o realizar emisión o exhibición alguna de este material, sin la autorización correspondiente.

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS. EL USO NO AUTORIZADO DE LOS CONTENIDOS PUBLICADOS EN ESTE SITIO DERIVARA EN EL INICIO DE ACCIONES LEGALES CONTEMPLADAS EN LA LEY DE DERECHOS DE AUTOR.

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado para mi madre

Lidia Otilia Yujra Iturralde y mi padre

Ing. Federico Donato Yujra Alvarez. Por

apoyarme y cuidarme a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Mayor de San Andres, que se convirtió en mi segundo hogar a lo largo de esta etapa.

A mi tutor Ing. Santiago Morales Ph.D, que fomento en todo momento para seguir adelante sin dar negativos. Siempre con una sonrisa, palabras de aliento y anécdotas interesantes.

A mis hermanos Dustin Yujra, Dra. Lisha Yujra y Gloria Yujra(+) por ser motivación para no rendirse, y la enseñanza de que todo lo bueno requiere su esfuerzo.

A mis primos Ing. Kevin Yujra y Kael Yujra que hicieron que esta etapa sea divertida y llena de recuerdos.

A mi tío Valentin Yujra por su enseñanza y ser hacedor de dar mis primeros pasos en esta etapa.

A la Ing. Faviola Vaqueda por su confianza y el aliento para seguir adelante y no bajar la cabeza.

A mis tribunales el Ing. Armenio Silva y el Ing. Miguel Velasquez por el conocimiento impartido y las observaciones acertadas para mejorar este proyecto.

RESUMEN

En el presente proyecto se realizó el estudio del crecimiento de microalgas nativas de la Laguna Colorada en medio artificial y medio natural a nivel laboratorio. Esta investigación realizada es del tipo aplicada, experimental y exploratoria. Esta se realizó en inmediaciones del Instituto de Investigaciones y Desarrollo de los procesos químicos (IIDEPROQ). Se observó la morfología de la microalga *Dunaliella Salina*, de muestras tomadas de la Laguna Colorada. Confirmando la presencia de la microalga. Además, el presente proyecto plantea la utilización del medio de cultivo F/2 Guillard como medio de cultivo artificial y un añadido de suero de leche para medio de cultivo natural.

A partir de la metodología se realizaron la cuantificación de microalgas con la cámara de Neubauer. Además de la cuantificación de Clorofila A en diferentes periodos de tiempo. Al momento de terminar la fase exponencial de crecimiento se realizó el secado del medio de cultivo. Al realizar este se estableció que el medio de cultivo puede contener 11.06g de microalga por cada litro de medio de cultivo artificial, Por otro lado, por cada litro de medio de cultivo natural se obtuvo 8.52g de microalga.

Tras la obtención de microalga seca, se realizó la extracción de Betacaroteno con diferentes concentraciones de solvente Acetona-Agua y Acetona-metanol. En la extracción en base seca con acetona-Agua 70/30 se obtuvo una cantidad de 2.04 mg de extracto por cada 100mg de microalga. Con Acetona-Metanol se obtuvo una cantidad de 2.6 mg de extracto por cada 100mg de microalga. Por otra parte, en la extracción en base húmeda con Acetona-Agua 70/30 se obtuvo 349 mg de extracto por cada litro de cultivo. Sin embargo, en la extracción Soxhlet se obtuvo 54.83mg de extracto por cada grado de microalga. Por consecuencia, se realizó la cuantificación por espectrofotometría en el extracto del método Soxhlet resultado una concentración del 5.56mg de betacaroteno por cada 100mg de extracto

Se postuló 3 modelos matemáticos para la proyección del crecimiento algal, entre los 3 el que mayor correlación y menor valor de error cuadrático medio fue la de Baranyi-Robertz.

Finalmente, con el software "SolidWorks" y con datos obtenidos en el presente proyecto se dimensionó un fotobioreactor con una capacidad de 50L para la producción de betacarotenos en condiciones ambientales de la ciudad de La Paz.

ABSTRACT

In this project, the study of the growth of native microalgae from Laguna Colorada in artificial and natural environments was carried out at the laboratory level. This research carried out is of the applied, experimental and exploratory type. This is carried out in the vicinity of the Institute for Research and Development of Chemical Processes (IIDEPROQ). The morphology of the microalgae *Dunaliella Salina* is observed, from samples taken from Laguna Colorada.

Confirming the presence of the microalgae. Furthermore, this project proposes the use of the F/2 Guillard culture medium as an artificial culture medium and an addition of whey for natural culture medium.

Based on the methodology, the quantification of microalgae was carried out with the Neubauer chamber. In addition to the quantification of Chlorophyll A in different periods of time. At the end of the exponential growth phase, the culture medium is dried. When carrying out this, it was established that the culture medium can contain 11.06g of microalgae per liter of artificial culture medium. On the other hand, for each liter of natural culture medium, 8.52g of microalgae were obtained.

After obtaining dry microalgae, the extraction of Betacarotene is carried out with different concentrations of Acetone-Water and Acetone-methanol solvent. In the extraction on a dry basis with acetone-Water 70/30, an amount of 2.04 mg of extract was obtained per 100 mg of microalgae. With Acetone-Methanol, an amount of 2.6 mg of extract per 100 mg of microalgae was obtained. On the other hand, in the wet base extraction with Acetone-Water 70/30, 349 mg of extract was obtained for each liter of culture. However, in the Soxhlet extraction, 54.83 mg of extract were obtained for each degree of microalgae. Consequently, quantification by spectrophotometry was carried out on the extract using the Soxhlet method, resulting in a concentration of 5.56 mg of beta-carotene per 100 mg of extract.

Three mathematical models were postulated for the projection of algae growth, among the three the one with the highest elevation and lowest mean square error value was the Baranyi-Robertz model.

Finally, with the "SolidWorks" software and with data obtained in this project, a photobioreactor with a capacity of 50L is sized for the production of beta-carotene under environmental conditions in the city of La Paz.

INDICE GENERAL

Capítulo I: Introducción	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA.....	2
1.3. OBJETIVOS.....	2
1.3.1. Objetivo general.....	2
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION.....	3
1.4.1. Justificación Académica	3
1.4.2. Justificación Social	3
1.4.3. Justificación Económica	4
1.4.4. Justificación Ambiental	4
2. CAPITULO II: MARCO TEORICO	5
2.1. INTRODUCCION	5
2.2. MICROALGAS	5
2.3. CLASIFICACION DE MICROALGAS.....	6
2.3.1. Cianobacterias.....	6
2.3.2. Rodofitas	7
2.3.3. Clorofitas.....	7
2.4. UTILIZACION DE MICROALGAS EN LA INDUSTRIA	7
2.5. HAEMATOCOCCUS PLUVIALES	7
2.6. DUNALIELLA SALINA.....	8
2.7. TOMA DE MUESTRA.....	9
2.8. SELECCIÓN DE MICROALGAS	9
2.9. AISLAMIENTO DE MICROALGAS.....	10
2.9.1. Aislamiento con micropipetas.....	10
2.9.2. Métodos basados en tactismos	11
2.9.3. Diluciones seriadas	11
2.9.4. Aislamiento en placa.....	11
2.10. PARAMETROS DEL CULTIVO.....	12
2.10.1. Temperatura	12
2.10.2. Agitación.....	12
2.10.3. Salinidad	12

2.10.4.	Luz	13
2.10.5.	Intensidad	13
2.10.6.	Fotoinhibicion	13
2.10.7.	Fotoperiodo	13
2.10.8.	Fuentes de luz	14
2.10.8.1.	Artificial	14
2.10.8.2.	Natural	14
2.10.9.	pH.....	14
2.11.	FOTOSINTESIS.....	15
2.12.	CLOROFILA.....	15
2.12.1.	Métodos de determinación de la clorofila.....	18
2.13.	B- CAROTENOS	18
2.13.1.	Beneficios	19
2.13.2.	Astaxantina	20
2.14.	FOTOBIOREACTORES.....	21
2.14.1.	Tipos de fotobioreactores.....	21
2.14.1.1.	Fotobioreactores abiertos	21
2.14.1.2.	Fotobioreactores cerrados	23
2.15.	MEDIOS DE CULTIVO	25
2.16.	MEDIOS DE CULTIVO.....	26
2.16.1.	Cultivo fototropico.....	26
2.16.2.	Cultivo heterotrofico.....	26
2.16.3.	Cultivo mixotrofico.....	27
2.16.4.	Cultivo fotoheterotrofico	27
2.16.5.	Medio de cultivo F/2 Guillard.....	27
2.17.	Cinética de crecimiento de la microalga.....	27
2.18.	DISEÑO DE FOTOBIOREACTORES.....	28
3.	CAPITULO III: METODOLOGIA	30
3.1.	TIPO DE INVESTIGACION.....	30
3.2.	TOMA DE MUESTRA.....	30
3.3.	Identificación de microalgas.....	31
3.4.	Aislamiento de microalgas	32

3.5.	Identificación del medio de cultivo	32
3.6.	Identificación del medio de cultivo natural	33
3.7.	Caracterización de parámetros de operación del fotobioreactor	33
3.7.1.	Fotoperiodo	33
3.7.2.	pH	34
3.7.3.	Agitación	34
3.7.4.	Temperatura	34
3.7.5.	Salinidad	34
3.8.	Conteo de microalgas	34
3.8.1.	Crecimiento de cultivos	36
3.8.2.	Determinación de clorofila	36
3.8.2.1.	Filtración	38
3.8.2.2.	Secado	39
3.8.2.3.	Extracción de clorofila	40
3.8.2.4.	Cuantificación por espectrofotometría	41
3.9.	Cinética de crecimiento algal	42
3.10.	Identificación de variables de mayor influencia dentro del proceso de extracción	43
3.10.1.	Identificación de variables	43
3.10.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL DEL DISOLVENTE	44
3.11.	Extracción de betacarotenos	46
3.11.1.	Extracción en base húmeda	46
3.11.2.	Extracción en base seca	46
3.11.3.	Extracción por Soxhlet	47
3.12.	Cuantificación de betacarotenos	47
3.13.	Escalamiento de laboratorio a planta piloto	48
3.13.1.	Dimensionamiento del fotobioreactor	48
3.13.2.	Sistema de presión del fotobioreactor	49
3.13.3.	Sistema de iluminación	50
4.	CAPITULO IV: CALCULOS Y RESULTADOS	52
4.1.	AISLAMIENTO DE MICROALGAS	52
4.2.	IDENTIFICACION DEL MEDIO DE CULTIVO	53

4.3. IDENTIFICACION DE VOLUMENES DE MEDIOS DE CULTIVOS EN LOS FOTOBIOREACTORES.....	54
4.4. CARACTERIZACION DE PARAMETROS DE OPERACIÓN DEL FOTOBIOREACTOR.....	56
4.4.1. Ph.....	56
4.4.2. Agitación.....	57
4.4.3. Temperatura.....	57
4.4.4. Salinidad.....	58
4.5. CONTEO DE MICROALGAS.....	59
4.6. CRECIMIENTO DE CULTIVOS.....	59
4.6.1. Medio de cultivo artificial.....	60
4.6.2. Medio de cultivo natural.....	61
4.7. DETERMINACION DE CLOROFILA.....	62
4.7.1. Filtración.....	62
4.7.2. Secado.....	63
4.7.3. Extracción de clorofila.....	63
4.7.4. Cuantificación por espectrofotometría.....	65
4.8. CINETICA DE CRECIMIENTO ALGAL.....	67
4.8.1. Medio de cultivo artificial.....	67
4.8.2. Medio de cultivo natural.....	69
4.9. EXTRACCION DE BETACAROTENOS.....	70
4.9.1. Extracción en base seca.....	70
4.9.2. Extracción por disoluciones.....	72
4.9.3. Extracción por Soxleth.....	73
4.10. CUANTIFICACION DE BETACAROTENOS.....	75
4.11. ESCALAMIENTO DE LABORATORIO A BENCH SCALE.....	77
4.11.1. Dimensionamiento del fotobioreactor.....	77
4.11.2. Sistema de presión del fotobioreactor.....	79
4.11.3. Sistema de iluminación.....	81
4.11.4. Fotobioreactor.....	82
5. CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	84
5.1. CONCLUSIONES.....	84
5.2. RECOMENDACIONES.....	85

6.	BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS.....	87
7.	ANEXOS.....	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microalgas	6
Figura 2 Microalga Haematococcus Pluviales.....	8
Figura 3 Microalga Dunaliella Salina	9
Figura 4 Estructura de la Clorofila a,b y c	16
Figura 5 Espectro de Absorción de Pigmentos	17
Figura 6 Estructura del Beta caroteno	19
Figura 7 Estructura de la Astaxantina	20
Figura 8 Estanque circular abierto.	22
Figura 9 Estanque de canalización	22
Figura 10 Fotobioreactor tubular horizontal (a) y fotobioreactor tubular inclinado (b)	23
Figura 11 Fotobioreactor de placa plana	24
Figura 12 Diferentes configuraciones de reactor air-lift	25
Figura 13 Curva de crecimiento cinético de la microalga (1 es la fase de adaptación, 2, fase de crecimiento exponencial, 3, fase de crecimiento lineal, 4, fase estacionaria y 5, fase de muerte.)	28
Figura 14 Laguna Colorada.....	31
Figura 15 Microalga Dunaliella salina.....	31
Figura 16 Aislamiento de microalgas por micro pipeta	32
Figura 17 Cámara de Neubauer.....	35
Figura 18 Crecimiento de cultivos	36
Figura 19 Diagrama de flujo de la determinación de clorofila método “Tricromatico”	37
Figura 20 Diagrama de flujo de Filtración	38
Figura 21 Diagrama de flujo del secado.....	39
Figura 22 Diagrama de flujo de la extracción de clorofila.....	40
Figura 23 Diagrama de flujo de la cuantificación por espectrofotometría de la clorofila .	41
Figura 24 Diagrama de Causa y Efecto del proceso de extracción de Betacaroteno	43
Figura 25 Diagrama de Pareto.....	45
Figura 26 Presencia de la microalga Dunaliella Salina.....	52
Figura 27 Aislamiento de microalgas en laboratorio	53
Figura 28 Ph vs tiempo MA	56
Figura 29 Ph vs tiempo MN	57
Figura 30 Temperatura vs tiempo	58
Figura 31 Conteo de microalgas.....	59
Figura 32 Crecimiento de cultivos	60
Figura 33 Crecimiento de microalgas Medio Artificial de 200ml de capacidad	61
Figura 34 Crecimiento de microalgas 200ml MN.....	62
Figura 35 Equipo de Filtración.....	63
Figura 36 Mortero y Pilon para pulverizar	64
Figura 37 Extracto de Clorofila.....	64
Figura 38 Clorofila vs tiempo Medio Artificial	66
Figura 39 Clorofila vs tiempo MN.....	67
Figura 40 Ln (X) vs tiempo MA	68

Figura 41 Ln (X) vs tiempo MN	69
Figura 42 Microalga seca rica en betacaroteno	70
Figura 43 Microalga seca rica en Astaxantina	71
Figura 44 Extracción base seca MA.....	71
Figura 45 Extracción Soxleth de microalga rica en betacaroteno	73
Figura 46 Extracción Soxleth de microalga rica en Astaxantina	74
Figura 47 Extracto de betacaroteno rico en betacaroteno (a) y extracto de betacaroteno rico en astaxantina (b)	74
Figura 48 Curva de calibración de betacaroteno	76
Figura 49 Determinación de la concentración de betacaroteno	76
Figura 50 FBR airlift vista frontal (a) y FBR con corte lateral (b)	82
Figura 51 Plano del FBR airlift vista frontal (a) y plano del FBR airlift corte lateral (b)	83

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Medio de cultivo F/2 de Guillard	33
Tabla 2 Características de suero de leche.....	33
Tabla 3 Resultados de ANOVA	44
Tabla 4 Coeficientes del modelo ajustado.....	45
Tabla 5 Mejor Concentración del disolvente	46
Tabla 6 Parámetros Generales para cultivo de microalgas	53
Tabla 7 Parámetros naturales de la microalga Dunaliella Salina	54
Tabla 8 Volumen de fotobioreactores	54
Tabla 9 Volumen de medio de cultivo Natural	55
Tabla 10 Cantidad de Sal en el medio de cultivo	58
Tabla 11 Conteo de microalgas MA	60
Tabla 12 Conteo de microalgas MN	62
Tabla 13 Clorofila en Medio Artificial de 200ml de capacidad.....	65
Tabla 14 Clorofila en Medio Natural en 200ml de capacidad	66
Tabla 15 Coeficiente de correlación MA	68
Tabla 16 Hipótesis Nula MA	68
Tabla 17 Coeficiente de correlación MN	69
Tabla 18 Hipótesis Nula MN	70
Tabla 19 Secado de microalga	70
Tabla 20 Extracción base seca MA.....	72
Tabla 21 Extracción por disoluciones sucesivas	72
Tabla 22 Extracción Soxleth	75
Tabla 23 Variables de dimensionamiento	79
Tabla 24 Variables de Presión.....	81
Tabla 25 Variables de Iluminación	82

CAPITULO I: INTRODUCCION

Capítulo I: Introducción

1.1. ANTECEDENTES

Hoy en día, más de 820 millones de personas siguen padeciendo hambre en todo el mundo, lo que destaca el inmenso reto que supone alcanzar el objetivo del hambre cero para 2030. El hambre está aumentando en casi todas las subregiones de África y, en menor medida, en América Latina y Asia occidental.

Otra realidad preocupante es que casi 2 mil millones de personas en todo el mundo padecen inseguridad alimentaria de moderada a grave. El hecho de que estas personas no tengan acceso regular a alimentos adecuados y nutritivos los pone en mayor riesgo de desnutrición y mala salud. Esta situación se concentra en países de ingresos bajos y medios (Mundo y De, 2019).

El valor nutricional de las algas microscópicas se ha apreciado desde hace muchos años porque contienen sustancias químicas de origen vegetal (fotoquímicos), carotenoides y otros antioxidantes similares a los que se encuentran en los vegetales verdes y el oro, cuyo consumo tiene propiedades beneficiosas para la salud. A partir de microalgas se pueden obtener espesantes como la carragenina y el agar; colorantes y antioxidantes como astaxantina (pigmento rojo), betacaroteno (pigmento amarillo anaranjado), clorofila (pigmento verde) y ficocianina (pigmento azul) y muchos otros; así como ácidos grasos, especialmente omega-3.

Por otro lado, el pigmento naranja betacaroteno es producido por *Dunaliella salina*, que también puede producir pigmentos equionina (rojo anaranjado) y zeaxantina (amarillo anaranjado) mediante una ligera modificación genética. El betacaroteno es un precursor de la vitamina A y, por tanto, es muy valorado en las industrias alimentaria y farmacéutica como antioxidante natural.

En general, las microalgas verdes son las mayores productoras de toda la gama de pigmentos (desde el rojo al azul) con posibles aplicaciones industriales. Los costos de producción se reducen mediante cambios metabólicos causados por estas microalgas o simples modificaciones en su entorno natural de crecimiento, como agregar sal, aumentar la temperatura o cambiar el pH (Froylán, 2017).

En Bolivia, a mediados de los años 1990, cuando se inició la producción de soja en el oriente, algunos grupos ambientalistas comenzaron a protestar por el tema porque incluso lo consideraban inviable. La controversia en torno a los biocombustibles vegetales surge de las preocupaciones sobre su impacto en el medio ambiente, provocando deforestación, competencia

con cultivos alimentarios y aumento de los precios de los alimentos. La producción de biocombustibles de primera generación requiere grandes cantidades de agua y energía.

1.2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En Bolivia, el 27% de los niños menores de 5 años padecen desnutrición crónica y el 8% padecen desnutrición grave. Las causas más comunes de esta enfermedad son la pobreza, la inseguridad alimentaria y la mala alimentación.

La deficiencia de vitamina A es un problema de salud pública en Bolivia, especialmente en niños menores de 5 años, mujeres en edad fértil y mujeres embarazadas. Las consecuencias pueden incluir, entre otras, riesgo de infección, problemas de visión y retrasos en el desarrollo. La deficiencia de vitamina A es causada por un suministro insuficiente de vitamina A, la falta de agua potable y ciertas enfermedades como el sarampión, la diarrea y otras.

La Laguna Colorada en Bolivia alberga una amplia variedad de microalgas, algunas de las cuales son conocidas por su alto contenido de betacaroteno. Sin embargo, aún no se ha desarrollado una tecnología eficaz y sostenible para extraer estos compuestos de las microalgas.

El betacaroteno es un pigmento natural con importantes propiedades nutricionales y funcionales. Son precursores de la vitamina A, esencial para la visión, el sistema inmunológico y la salud de la piel. Además, tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a prevenir enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

Existen varias formas de cuantificar y determinar la presencia de betacaroteno en una muestra, la más utilizada es la determinación cuantitativa del colorante con metanol caliente, así como la lectura por espectrofotometría, conteo de células en cámara de Neubauer (Mendiola,). 2008).

Por lo anteriormente mencionado, ¿Será posible cultivar microalgas en fotobioreactores y separar los beta-carotenos del total de la biomasa hasta llegar a un grado comercial, en condiciones ambientales de la ciudad de La Paz?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Cultivar microalgas provenientes de la Laguna Colorada en medio sintético y suero lácteo, en fotobioreactores, para extraer betacarotenos por diferentes técnicas de la biomasa producida en condiciones ambientales de la ciudad de La Paz.

1.3.2. Objetivos específicos

- Seleccionar y verificar la presencia de las microalgas nativas provenientes de la Laguna Colorada.
- Proponer un fotobioreactor con sus parámetros para la producción de microalgas en condiciones naturales en el Campus de Cota Cota.
- Realizar la cuantificación de masa algal con ayuda del equipo HPLC y con los métodos espectrofotométricos
- Realizar pruebas para ver la eficiencia de la presencia de suero de leche en el cultivo.
- Proponer una cinética para el crecimiento microalgal.
- Extraer con diversas técnicas el betacaroteno de la masa algal.
- Realizar el escalamiento teórico de laboratorio a bench scale para la producción de betacarotenos en condiciones de la Ciudad de La Paz.
- Comparar el rendimiento entre los métodos de extracción.

1.4. JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION

1.4.1. Justificación Académica

El presente trabajo permitirá mostrar y aplicar los conocimientos adquiridos en las materias de pregrado, la Carrera de Ingeniería Química y también la metodología de la investigación científica, como ser en diversas operaciones unitarias, diseño de reactores bioquímicos y en la aplicación de biotecnología.

1.4.2. Justificación Social

Recobrando una investigación realizada, estos estudios podrán proporcionar una mayor información respecto al uso de las microalgas para fines alimenticios, con recursos naturales existentes en Bolivia lo cual a largo plazo podrá permitir futuras investigaciones en el campo de microalgas, pero sobre todo en el campo alimenticio, las cuales podrán ser aprovechadas por la sociedad, a través de la industria.

1.4.3. Justificación Económica

A partir de la realización de estos estudios y esperando conclusiones exitosas se podrá considerar darle un valor agregado al producto para poder comercializarlo, así mismo se podrá señalar que los estudios con microalgas en el país son aún no muy sofisticados, por tanto, el presente estudio permitirá desarrollar futuras aplicaciones a escalas industriales, de las microalgas, pudiendo llegar a tener un alto potencial económico en el mercado.

1.4.4. Justificación Ambiental

En las últimas décadas la contaminación hídrica por parte de las industrias y minería han llegado a ser muy altas, lo que generó el estudio y la implementación de varios métodos para poder tratar y remediar estos recursos hídricos; uno de ellos, el uso de microalgas para poder realizar biorremediación de aguas residuales se ha establecido como un método convencional eficiente, ya que este no genera altos residuos al finalizar el proceso, además genera suplementos alimenticios como los betacarotenos con bajo impacto ambiental, constituyéndose en un proceso amigable con el medio ambiente, además la búsqueda de fuentes de alimentos alternativas respecto a las grandes industrias se está volviendo prioridad con el paso del tiempo. Nuestro País al tener un reservorio natural de microalgas como la *Dunaliella salina* no tiene la necesidad de realizar la importación de estas microalgas

CAPITULO II: MARCO TEORICO

2. CAPITULO II: MARCO TEORICO

2.1.INTRODUCCION

La investigación con microalgas ha alcanzado una enorme importancia debido, fundamentalmente, a la combinación de usos que pueden tener. Se pueden utilizar con fines energéticos, principalmente para la obtención de biodiesel, aunque también se pueden obtener otros biocombustibles como bioetanol, biometano, biohidrógeno y generar calor y electricidad. Otras aplicaciones comerciales de las microalgas buscan obtener productos de alto valor añadido con aplicaciones en la nutrición y salud humanas, acuicultura, cosméticos y biofertilizantes. Además, las microalgas pueden ayudar, durante su crecimiento, a reducir las emisiones de CO₂ por biomitigación biológica e intervenir en el tratamiento de aguas residuales. (Microalgas & González-arechavala, 2014)

El desarrollo de tecnologías orientadas al cuidado del medio ambiente, a la reutilización de los residuos, a la generación de energías limpias y obtención de suplementos de bajo costo se ha tornado indispensable. Entre estas tecnologías, los cultivos de microalgas adquieren un gran protagonismo, al ser considerados eco-amigables ya que reciclan eficientemente contaminantes desde medios líquidos y gaseosos. También teniendo pocas exigencias en su cultivo, incorporándolos a su metabolismo para generación de biomasa (Hernández-Pérez & Labbé, 2014)

2.2.MICROALGAS

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares o multicelulares, localizados en diversos hábitats, tales como aguas marinas, dulces, salobres y residuales. Se presentan bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; son responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Se estima que existen más de 100,000 especies

Las microalgas(figura 1), también conocidas como fitoplancton, son el nombre común de todos los organismos acuáticos autótrofos que viven en suspensión en la columna de agua. Este nombre se refiere a varios filos, en su mayoría eucariotas, pero incluidos los procariotas fotosintéticos conocidos como cianobacterias. Como organismos fotosintéticos, este grupo juega un papel importante en la productividad de los océanos y constituye la base de la cadena alimentaria marina. Además, el fitoplancton es responsable de la mitad del oxígeno liberado en la atmósfera.(Mayorga et al., 2017)

Se encuentran en diferentes formas, son típicamente pequeñas con un diámetro de 3 a 30 μm , constituidas por proteínas, carbohidratos y lípidos(García Estrada, 2014)



Figura 1. Microalgas

Fuente: Algatex (2022) Biotecnología en microalgas. <https://www.algatex.org/semilla-de-microalgas/>

2.3.CLASIFICACION DE MICROALGAS

Las microalgas se pueden clasificar por reino, división, clase, familia, género y especie. Conociendo el género y la especie ya se puede averiguar las necesidades nutricionales que tendrá la microalga de forma que se puede ubicarla en un medio adecuado(Sanz, 2019)

2.3.1. Cianobacterias

Este tipo de algas son procariotas, pertenecen al reino de las bacterias. Son organismos planctónicos sin movilidad y se suelen encontrar en ambientes extremos, tanto en aguas saladas como dulces, pudiéndose encontrar solas o agrupadas en filamentos. Algunas especies pueden encontrarse en la superficie de los medios acuáticos debido a que existe gas almacenado en sus vacuolas. Si en el medio existe una alta concentración en nutrientes, puede favorecer un crecimiento rápido y acumulación de algas en el medio denominado como Bloom.

2.3.2. Rodofitas

Este tipo de microalgas son características de los medios marinos y en los que existen temperaturas moderadas, se encuentran normalmente en regiones templadas y tropicales. Morfológicamente no disponen de flagelos. Su pared celular está compuesta de una capa microfibrilar de celulosa o xilano y por mucílagos de polisacáridos. Este grupo de algas también se conoce como algas rojas.

2.3.3. Clorofitas

Este tipo de microalgas constituyen un extenso grupo dentro de las microalgas eucariotas con una gran variedad morfológica, tanto a nivel macroscópico como microscópico. Se encuentran principalmente en agua dulce, aunque también pueden encontrarse en medios marinos o en ambientes subaéreos. En muchos casos son capaces de desarrollar relaciones simbióticas con otros organismos. Las especies más estudiadas de este grupo son *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Pediastrum*. Este grupo de algas también se conoce como algas verdes. (Sanz, 2019)

2.4.UTILIZACION DE MICROALGAS EN LA INDUSTRIA

Las microalgas presentan un amplio rango de aplicaciones derivadas de su uso, desde producción de biomasa para alimentación, su empleo en acuicultura o su uso como biofertilizante, hasta la obtención de productos de valor terapéutico o industrial. Las microalgas son una fuente rica en numerosas moléculas bioactivas, cosméticos y de interés en alimentación y salud humana.

El Beta-caroteno es un precursor de la vitamina A, que es esencial para muchas funciones en el cuerpo humano, tales como visión, el crecimiento y desarrollo de los huesos y actúa como una coenzima, de igual forma, tiene funciones en el equilibrio de las hormonas. La capacidad antioxidante de las microalgas despierta interés en la terapia de enfermedades relacionadas con la oxidación, como la degeneración macular o diverso tipo de inflamaciones, así como en la prevención de ciertos desarrollos tumorales

2.5.HAEMATOCOCCUS PLUVIALES

Es un alga verde de agua dulce, unicelular, de la familia de las Haematococcaceae. Esta especie es bien conocida por el alto contenido en astaxantina que presentan sus quistes de resistencia. La astaxantina es segregada como una forma de proteger el fotosistema cuando la célula percibe que las condiciones no son favorables y desencadena la respuesta de enquistamiento. Esta Astaxantina(figura 2) protege del daño oxidativo que pudiera ocasionarle al fotosistema una

radiación de alta energía como la radiación UV, incluso se ha encontrado que puede originar una cierta resistencia a estos microorganismos frente a radiación gamma o rayos X. Algunos ejemplos de condiciones desfavorables pueden ser una radiación de alta energía, aumento de la salinidad, aumento del daño oxidativo al fotosistema, baja disponibilidad de nutrientes o desecación. <https://www.naturalista.mx/taxa/467001-Haematococcus-pluvialis>

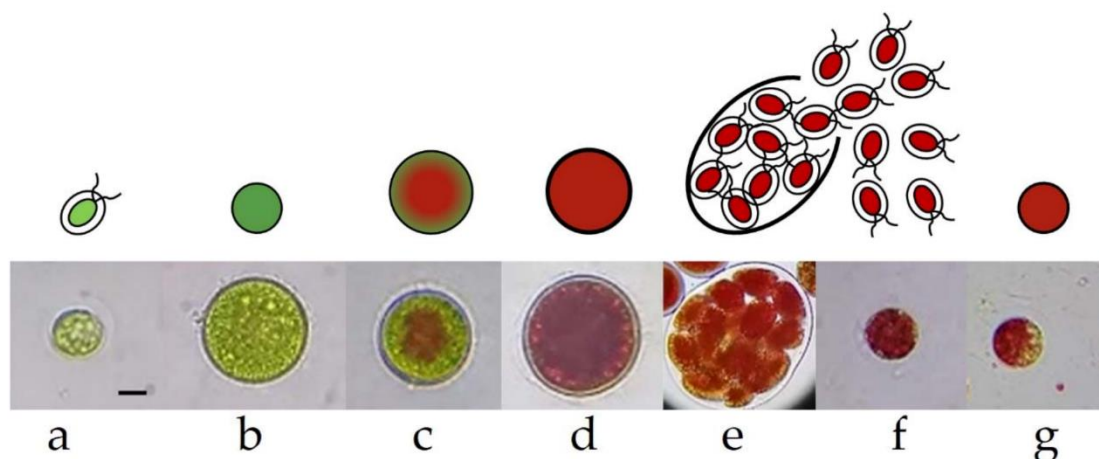


Figura 2 Microalga *Haematococcus Pluvialis*

Fuente: (Bauer, 2021) Nutritional properties of microalgae for mariculture.

2.6.DUNALIELLA SALINA

Es una microalga verde encontrada principalmente en ambientes de agua salada y que es conocida por su actividad antioxidante protegiendo contra los radicales libres; debido a su habilidad de acumular carotenoides como el β -caroteno, luteína y zeaxantina, es utilizada en la industria de alimentos para la elaboración de suplementos alimenticios (Serpa Ibáñez & Calderón Rodríguez, 2006).

Cuando las células de *Dunaliella Salina* (figura 3) estresan, comienzan a producir carotenoides protectores en las células (Castro Tapia, 2021), especialmente β -caroteno, cambiando el color de sus células de verde a anaranjado o rojo debido a que se encuentran en condiciones extremas como salinidad alta, radiación solar alta y bajos niveles de nitrógeno (García-Romeral et al., 2017). Hoy en día se sabe que *Dunaliella salina* la mejor fuente comercial de β -caroteno natural, entre todos los organismos en el mundo (Parte, 1992a).

El β -caroteno ayuda a disminuir los efectos dañinos de los radicales libres, los cuales se asocian a varias formas de cáncer. La luteína y la zeaxantina se relacionan a la disminución del

riesgo de enfermedades crónicas como cataratas, la degeneración macular, la arteriosclerosis y también en la prevención del cáncer(Yáñez, 2016).

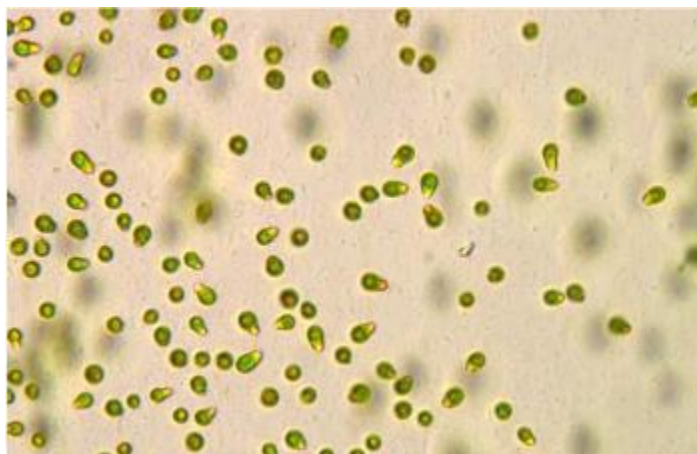


Figura 3 Microalga Dunaliella Salina

Fuente: Algatex (2022) Biotecnología en microalgas. <https://www.algatex.org/service/dunaliella-salina/>

2.7.TOMA DE MUESTRA

Consiste en introducir en el agua en forma vertical mantenerla unos segundos y empezar el izado del recipiente. Utilizando los medios necesarios, se sitúa en el punto de muestreo y seguidamente se procede a tomar la muestra, para ello se debe cumplir con lo siguiente.

- Tener conocimiento de la profundidad del punto de muestreo
- Verificar las condiciones del recipiente
- Bajar el muestreador guardando la verticalidad
- Recolectar la muestra cuidadosamente.
- Mantener la muestra refrigerada menor a 10°C.

2.8.SELECCIÓN DE MICROALGAS

Al plantearse el cultivo microalgal deben seleccionarse cepas que sean fácil de cultivar en cultivos masivos con altas productividades y que tengan interés económico. Una de las vertientes más desarrolladas del cultivo masivo de microalgas es su utilización como fuente de derivados biomédicos o compuestos químicos de interés. Básicamente se distinguen dos tipos de estrategias de búsqueda de cepas de este tipo. El primer tipo puede ser considerado como un método directo, en el que se busca una actividad bioespecífica o un compuesto determinado en un gran número de

extractos de especies. Cuando se encuentra la actividad deseada, se intenta aislar y caracterizar el/los compuestos responsables de dicha actividad, y en el caso de un producto su obtención en forma purificada. El segundo tipo de método es indirecto, no se dirige inicialmente hacia la detección de una actividad bioespecífica o compuesto determinado. Las células se reducen a extractos y los compuestos obtenidos son separados, aislados, caracterizados y cuantificados. Si procede, los compuestos aislados son utilizados para detectar una amplia gama de bioactividades. (Abalde Alonso et al., 1995)

La metodología para la selección de microalgas implica varios pasos

- Recogida de muestras de la Laguna colorada
- Verificación en microscopio óptico la presencia de la microalga
- Crecimiento en medio de cultivo con elevada concentración de NaCl.
- Selección en tubo de ensayo o matraz Erlenmeyer de baja capacidad. Después de 3 o 4 días presenta una estirpe carotenogénica, que se presenta en forma de una película color naranja en la superficie, se puede recoger fácilmente con una pipeta Pasteur. Incubándolo en un recipiente con medio de cultivo. Este paso se repite las veces que sea necesario.

2.9. AISLAMIENTO DE MICROALGAS

La obtención de cepas para cultivo puede realizarse mediante el aislamiento de microalgas del medio natural o bien pueden obtenerse en universidades, centros de investigación y centros especializados en colecciones de cultivos en todo el mundo, en los que se mantienen muchas líneas puras de especies microalgales. Al plantearse el cultivo microalgal deben seleccionarse cepas que sean fáciles de cultivar en cultivos masivos con altas productividades y que tengan interés económico.

2.9.1. Aislamiento con micropipetas

Este sistema de aislamiento permite obtener cultivos microalgales partiendo de una muestra con diversidad poblacional. Permite un amplio intervalo de separación entre microalgas móviles y no móviles, ya que las primeras son aisladas con mayor facilidad por este método. Para realizar el aislamiento se parte de una muestra que previamente es concentrada por centrifugación y que se mantiene en cultivo durante 48 horas. Una gota del cultivo obtenido se coloca en el extremo anterior de un portaobjetos y se sitúa en la platina del microscopio. Justamente al lado, se establece una superficie larga y delgada hasta el extremo del portaobjetos de medio fresco y estéril.

Posteriormente, se establece una delgada unión entre la gota del cultivo y la superficie con micro pipeta cerrada. No se obtienen cultivos axénicos.

2.9.2. Métodos basados en tactismos

Son muy útiles para microalgas móviles. Consisten en crear un gradiente (de luz, temperatura, salinidad, etc.) dentro de un tubo, casi capilar y añadir la muestra que queremos aislar en uno de sus extremos. Las algas móviles nadarán activamente hacia la luz, o hacia la temperatura idónea. Generalmente los aislamientos por fototactismo dan buenos resultados, aunque no es un método que permita aislar con seguridad una sola célula. Tampoco se obtienen cultivos axénicos. La disponibilidad de micro manipuladores facilita los dos métodos anteriores.

2.9.3. Diluciones seriadas

El material original puede ser diluido seriadamente varias veces en medio de cultivo estéril y se toman pequeños volúmenes de cada dilución para transferir a recipientes de cultivo, que se incuban con la luz y la temperatura adecuada. Generalmente se dispone de una gradilla con tubos de ensayo llenos de medio de cultivo. En uno de ellos se pone una gota del agua donde se supone que existen los organismos que interesa aislar, se agita y se pasa una gota de esta mezcla al segundo tubo, y así sucesivamente. De este modo se obtienen diluciones progresivamente superiores. Después de varios días se detecta por examen microscópico de muestras de cada contenedor aquel con cultivos unialgales. Es un método que, aunque resulta muy sencillo y poco laborioso no permite conocer a priori que especie se va a aislar. Presenta el inconveniente de que siempre se aíslan las especies más abundantes, por lo que puede resultar práctico para aislar especies dominantes en un "Bloom" microalgal. Como norma general se procura aislar de muestras recién cogidas, o bien de muestras que se enriquecen con nutrientes o se pasan directamente a medios de cultivo.

El éxito de los aislamientos es bajo, entre 1-20%, por lo que conviene realizar un número elevado de ellos. Suelen obtenerse mejores resultados pasando las algas recién aisladas a tubos de ensayo con poco volumen de medio, y esperar a que alcancen un número elevado de individuos antes de pasarlos a los frascos o cajas estándar.

2.9.4. Aislamiento en placa

La mayoría de las microalgas crecen bien en una placa Petri o en tubo sobre agar al 1-2% preparado con medio de cultivo. Si el material original se siembra por estría en la superficie del agar con un asa curva será posible después de varios días de incubación a la luz y con la temperatura adecuada, retirar colonias aisladas que se habrán formado a partir de una única célula microalgal.

Sin embargo, puede ser necesario repetir el proceso 2 o 3 veces hasta conseguirlo. Estas colonias unialgales pueden ser entonces asépticamente transferidas a medio de cultivo estéril. Una vez aisladas, los cultivos de microalgas pueden ser tratados para dejarlos libres de contaminación bacteriana y obtener cultivos axénicos.

Una de las vertientes más desarrolladas del cultivo masivo de microalgas es su utilización como fuente de derivados biomédicos o compuestos químicos de interés. Básicamente se distinguen dos tipos de estrategias de búsqueda de cepas de este tipo.

2.10. PARAMETROS DEL CULTIVO

2.10.1. Temperatura

La saturación de la luz en la fotosíntesis está influenciada por factores como la concentración de nutrientes, la composición química y particularmente la temperatura. Sin embargo, la interacción entre la intensidad de luz y la temperatura es muy marcada. Ambos factores afectaron de forma significativa al crecimiento y composición de pigmento. En cuanto al contenido celular en clorofilas, se comportan respecto a la intensidad de luz

2.10.2. Agitación

La agitación es un factor que afecta la disponibilidad de nutrientes hecho que influye en un nivel de producción más elevado; en tanto que afecta la cantidad de luz que recibe cada microalga mientras se dispersan al interior del FBR ya que, evita que las células se asienten e incide en la distribución homogénea de los nutrientes al proporcionar un suministro adecuado de CO₂ a través de la interacción cultivo-burbuja y así mismo la eliminación de O₂ al generar turbulencia en el medio(Alejos, 2017)

2.10.3. Salinidad

Las concentraciones de sales orgánicas disueltas afectan significativamente el crecimiento de algunas microalgas, para un cultivo óptimo de *Dunaliella salina* es necesario tener cierta concentración en el medio.

La salinidad puede ser importante para la acumulación de ciertos productos de interés, como glicerol y beta-caroteno, como ya se indicó. Altas salinidades aumentan el contenido en beta-caroteno de *Dunaliella salina* (Brown et al., 1997).

2.10.4. Luz

La luz constituye un factor fundamental en todo cultivo de microalgas, tanto por sí misma como por sus interrelaciones con otros parámetros. La radiación utilizable fotosintéticamente cae dentro del rango del espectro visible (400 - 700 nm). Representa la fuente de energía para la fotosíntesis, y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperiodo afectan al crecimiento y metabolismo microalgal (Lips y Avissar, 1986).

2.10.5. Intensidad

Una célula que se encuentre en condiciones limitadas de luz (sombra) crecerá lentamente, pero hará que la mayor parte de esa energía luminosa sea asequible al producir un sistema más eficiente de captura de luz. La adaptación a bajas intensidades implica un incremento de dos a diez veces el contenido de clorofila por célula

2.10.6. Fotoinhibición

Las intensidades de luz muy elevadas con frecuencia son inhibitorias para el crecimiento microalgal, produciendo fotoinhibición. La fotoinhibición o fotoinactivación puede definirse como el descenso de la capacidad fotosintética a elevadas intensidades de luz, muy por encima de los valores de saturación, es decir, muy superiores a las requeridas para obtener la tasa máxima de fotosíntesis.

Las intensidades de luz elevadas también pueden inhibir la respiración en células fotosintéticamente activas; el mecanismo implicado parece ser la destrucción de citocromos por la luz.

2.10.7. Fotoperiodo

En condiciones normales las microalgas están sometidas a periodos de luz/ oscuridad y esta alternancia generalmente se utiliza también en su cultivo. Muchos aspectos de la fisiología microalgal fluctúan en un ciclo de 24 horas (diario).

- División celular: en muchas especies la mayoría de las células se dividen en un momento determinado del día o de la noche, lo que favorece su sincronización; al parecer la división nocturna ocurre en muchas especies, especialmente las que se estudian en cultivo.
- Capacidad fotosintética: con frecuencia se observa que las tasas máximas de fotosíntesis se producen en la mañana y las mínimas al anochecer;
- Absorción de nutrientes: las tasas de absorción de N y P son mayores durante el día que durante la noche, lo que refleja la influencia de la luz sobre la absorción.

- Bioluminiscencia: generalmente se detecta un pico nocturno de bioluminiscencia en las especies que la poseen (dinoflagelados). Estos ritmos circadianos diarios persisten bajo condiciones ambientales constantes.

2.10.8. Fuentes de luz

Cuando los demás factores están dentro de límites razonables, la disponibilidad de luz es el principal factor que influye en la productividad de los cultivos microalgales masivos, de ahí la importancia de la fuente de luz para el cultivo. La luz utilizada para el cultivo de microalgas puede ser luz artificial o luz natural.

2.10.8.1. Artificial

Las fuentes de luz artificial tienen espectros de emisión que no son necesariamente idénticos a la luz del sol y la calidad de la luz puede afectar al crecimiento, metabolismo, reproducción y morfología de una clase de microalgas, por lo que habrá que estudiar el espectro más favorable para cada tipo a cultivar. Las lámparas fluorescentes tubulares son la fuente de luz preferida para la iluminación de cultivos interiores. Estas dan menos calor que otros tipos de luz artificial y son igualmente eficientes en promover tasas de división y crecimientos máximos. Los tipos usados comúnmente son "Daylight", "Cool-White" y "Grolux". Los sistemas de cultivo masivo deben ser diseñados para maximizar la eficiencia de utilización de la luz.

2.10.8.2. Natural

Muchos sistemas de cultivo masivo de microalgas se diseñan para utilizar luz natural. Esto puede reducir significativamente el coste de producción de las algas en el sistema, pero dependiendo de la situación geográfica puede ser menos seguro y las tasas de producción pueden variar considerablemente a lo largo del año. Otro aspecto a considerar es que la radiación luminica cambia considerablemente durante el crecimiento. La intensidad media de luz disponible para una célula depende del ensombrecimiento por otras células, esto es, de la densidad celular.

2.10.9. pH

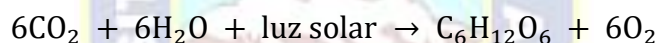
El pH es uno de los factores más importantes en el cultivo microalgal. Las membranas plasmáticas de las células microalgales no son libremente permeables a los iones hidrógeno e hidroxilo, por lo tanto, las concentraciones de hidrogeniones intracelular y extracelular no están necesariamente equilibradas y existe un gradiente de concentración de hidrogeniones a través de la membrana.

A su vez, el pH se ve afectado por la capacidad tampón y composición del medio de cultivo, cantidad de dióxido de carbono disuelto, temperatura -que a su vez controla la solubilidad del dióxido de carbono y actividad metabólica de las células microalgales; la fuente de N suministrada para el crecimiento juega un papel interactivo muy importante.

2.11. FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis es un proceso metabólico que llevan a cabo algunas células de organismos autótrofos para sintetizar sustancias orgánicas a partir de otras inorgánicas. De esta forma se convierte la energía luminosa en energía química estable.

Durante la fotosíntesis, la planta captura la luz solar a través de la clorofila y la utiliza junto con el dióxido de carbono y el agua para producir glucosa y oxígeno. Este proceso se puede representar mediante la siguiente ecuación química:



El adenosin trifosfato (ATP) es la primera molécula en la cual dicha energía química queda almacenada. Dichas moléculas de ATP se utilizan para sintetizar otras moléculas orgánicas más estables. La fotosíntesis es imprescindible para la vida de nuestro planeta ya que, a partir de luz y materia inorgánica, se sintetiza materia orgánica, permitiendo fijar dióxido de carbono y liberar oxígeno. Los factores externos afectan a la fotosíntesis son la temperatura, la intensidad luminosa, el tiempo de iluminación y la concentración de dióxido de carbono y oxígeno del aire.

La fotosíntesis se divide en dos etapas principales: la fase luminosa y la fase oscura. En la fase luminosa, la luz solar es capturada por la clorofila y se produce energía química en forma de ATP y NADPH. Estas moléculas de alta energía se utilizan posteriormente en la fase oscura para convertir el dióxido de carbono en glucosa. (González, 2015)

2.12. CLOROFILA

Los organismos fotosintéticos que evolucionan con el oxígeno contienen clorofila a (Chl a) que participan en las reacciones fotoquímicas del fotosistema I (PSI), y del fotosistema II (PSII). La clorofila a es el principal pigmento fotosintético de estos organismos y su concentración en microalgas está relacionada con la nutrición mineral en los medios de cultivo y la exposición a la luz. En las células sanas, se ha informado que su contenido constituye alrededor del 5% del peso

de la biomasa seca. Las clorofilas se encuentran en orgánulos intracelulares llamados cloroplastos, donde se unen a las proteínas que forman las lamelas del cloroplasto. Son membranas que encierran "sacos" aplanados llamados tilacoides, donde se absorbe la luz durante el proceso de fotosíntesis (Dujardin et al., 1975). El proceso de evolución distribuyó las Chl a, b, c, d y f entre los diversos grupos de microalgas, y su presencia o ausencia es de importancia taxonómica (Ritchie, 2006).

La concentración de clorofila-a (figura 4) se utiliza para estimar en forma indirecta la biomasa de las comunidades fitoplanctónicas, debido a que es el principal pigmento fotosintético presente en las algas (Gregor & Maršálek, 2004). La clorofila-a también es un indicador del grado de contaminación de los ecosistemas acuáticos y un importante índice del estado fisiológico del fitoplancton

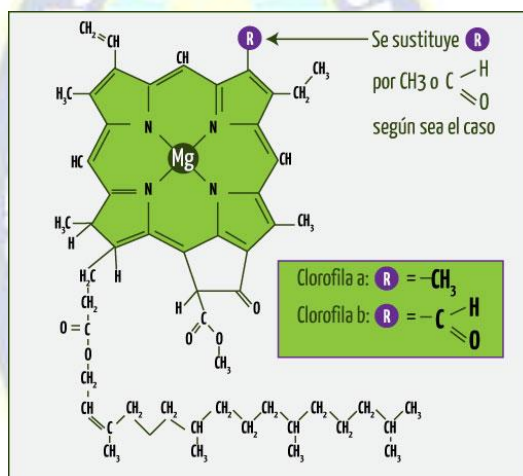


Figura 4 Estructura de la Clorofila a,b y c

FUENTE: Paul Monar B. (2015) Principales Pigmentos Vegetales.

<https://hpmonarb.blogspot.com/2017/08/pigmentos-en-las-plantas.html>

En la fotosíntesis, la energía solar se convierte en energía química mediante organismos fotosintéticos. Sin embargo, en la fotosíntesis no se usan de igual manera todas las distintas longitudes de onda en la luz del sol ya que los organismos fotosintéticos contienen moléculas llamadas pigmentos que absorben solo longitudes de onda específicas de la luz visible, mientras que reflejan otras.

El conjunto de longitudes de onda (figura 5) que absorbe un pigmento se conoce como su espectro de absorción. En el siguiente diagrama, puedes ver los espectros de absorción de tres pigmentos importantes en la fotosíntesis: clorofila *a*, clorofila *b* y beta-caroteno. El conjunto de

longitudes de onda que un pigmento no absorbe, se refleja, y la luz reflejada es lo que vemos como color. Por ejemplo, percibimos las plantas de color verde por su gran contenido de moléculas de clorofila *a* y *b*, que reflejan luz verde.

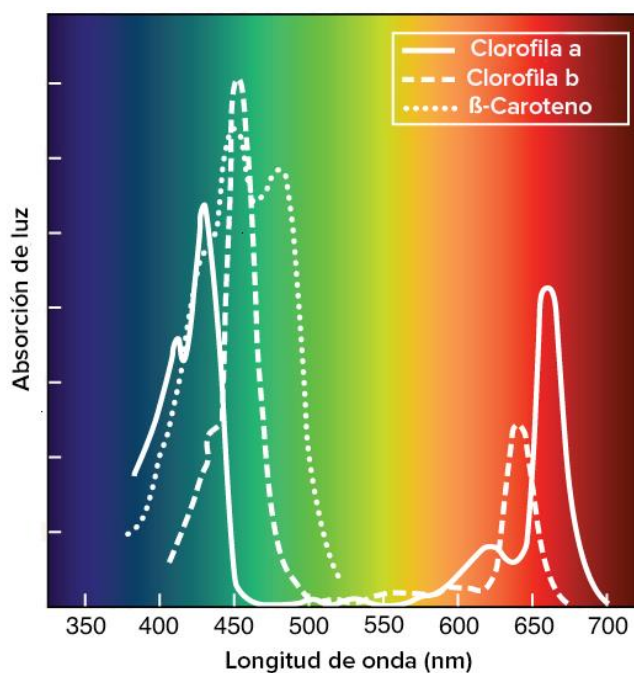


Figura 5 Espectro de Absorción de Pigmentos

FUENTE: Khan Academy 2024,

<https://es.khanacademy.org/science/biology/photosynthesis-in-plants>

En el método tricromático para la extracción de clorofila, se miden las absorbancias de luz a tres longitudes de onda específicas: 665 nm, 647 nm y 750 nm. Esto se debe a que los dos pigmentos fotosintéticos principales que se quieren cuantificar, la clorofila *a* y *b*, tienen diferentes espectros de absorción de luz.

A 665 nm la absorbancia es principalmente atribuible a la clorofila *a*, ya que este pigmento tiene un pico de absorción en esta longitud de onda.

A 647 nm la absorbancia es principalmente atribuible a la clorofila *b*, ya que este pigmento tiene un pico de absorción en esta longitud de onda.

A 630 nm la absorbancia es principalmente atribuible a la clorofila *c*, ya que este pigmento tiene un pico de absorción en esta longitud de onda.

A 750 nm la absorbancia se utiliza como referencia, ya que esta longitud de onda no es absorbida significativamente por la clorofila a ni b. Se resta de las mediciones a 665 nm y 647 nm para eliminar la interferencia de la luz dispersa y otros pigmentos.

2.12.1. Métodos de determinación de la clorofila

Para la extracción y determinación del contenido de clorofilas totales de la biomasa se utiliza el método espectrofotométrico propuesto por Hansmann y se realizan los cálculos según la fórmula siguiente, propuesta por Jeffrey y Humphrey.

$$\text{Clorofila} - a = \frac{(11.85 * A_{665} - 1.54 * A_{647} - 0.08 * A_{630}) * V_{\text{extraido}}(l)}{V_{\text{Muestra filtrada}}(l)} \quad (1)$$

Donde A_{640} , A_{647} , A_{630} y A_{750} es la densidad óptica medida a las longitudes de onda indicadas en nm, V es el volumen del extracto y V el volumen de agua filtrada en litros. La metodología de este método consiste en medir un determinado volumen de muestra a través de un filtro de microfibra de vidrio. Se introduce el filtro en el tubo donde se realizará la extracción y se añade en el tubo con el filtro una cantidad aproximada de 5 ml de disolución de acetona al 90 %. Se tapan los tubos con papel de aluminio para mantenerlos en oscuridad y se colocan los tubos en baño de agua y hielo sonicando 30 segundos. Posteriormente se realiza una pausa de 10 segundos y se vuelve a sonicar otros 30 segundos. Se debe mantener en frío, entre 0 y 4 °C, y en oscuridad durante 12-24 horas, pudiendo agitarse el tubo un par de veces. Finalmente se centrifuga durante 5-10 minutos a 3.000 rpm y se mide después con el espectrofotómetro. Es importante utilizar cubetas de vidrio y llenarlas con el extracto hasta $\frac{3}{4}$ partes para medir la absorbancia a 630, 647, 664 y 750 nm. Por último, se aplica la ecuación (1) para obtener los resultados de clorofilas.

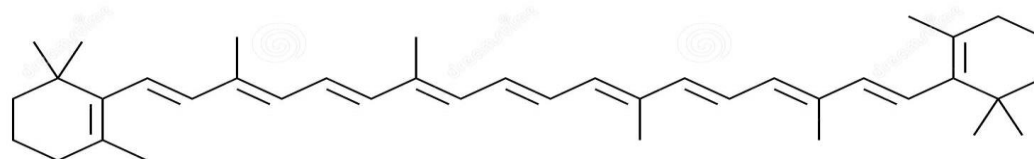
2.13. B- CAROTENOS

Se conoce en la naturaleza cerca de 100 sustancias con efecto provitamina A, de los cuales el Beta-Caroten(figura 6) es el más extendido y eficaz.

Esta sustancia se transforma en vitamina A en la mucosa intestinal. Está presente principalmente en la parte vegetativa de las plantas, lo que significa que los forrajes verdes son la principal fuente de obtención de esta vitamina.(Santamaría, n.d.)

Los efectos de la suplementación con betacaroteno sobre la mortalidad y la incidencia del cáncer se han investigado en diferentes poblaciones. Un meta análisis reciente proporcionó

evidencia de un aumento significativo de la mortalidad en los participantes que recibieron suplementos de betacaroteno. El efecto nocivo de la suplementación con betacaroteno sobre el cáncer de pulmón también quedó bien establecido en fumadores y trabajadores con amianto que recibieron un suplemento de 20 a 30 mg de betacaroteno por día. Por el contrario, los ECA proporcionaron resultados divergentes para otros sitios de cáncer. Si bien la mayoría de los ECA no mostraron ningún efecto significativo de la suplementación con betacaroteno con respecto a ningún sitio del cáncer, la suplementación con dosis bajas de betacaroteno (6 a 15 mg al día) se asoció con una disminución de la incidencia de cáncer en todos los sitios en hombres franceses y gástricos. Se sugirió una mayor incidencia de cáncer de próstata en hombres con un antígeno prostático específico elevado al inicio del estudio suplementado con betacaroteno en combinación con otros antioxidantes. (Druesne-Pecollo et al., 2010)



β -Carotene

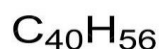


Figura 6 Estructura del Beta caroteno

FUENTE: Peter Hermes Furian, 2020, Estructura química y formula de betacaroteno <https://es.dreamstime.com/estructura-qu%C3%ADmica-y-f%C3%B3rmula-de-betacaroteno-pigmento>

2.13.1. Beneficios

Consumir alimentos ricos en beta carotenos puede reducir el riesgo de desarrollar enfermedades oculares como cataratas y degeneración macular relacionada con la edad.

Además de sus beneficios para la visión y la protección celular, los beta carotenos también pueden fortalecer el sistema inmunológico y promover la salud de la piel. Se ha demostrado que estos compuestos estimulan la función de las células inmunitarias, mejorando la respuesta del sistema inmunológico ante infecciones y enfermedades.

Los beta carotenos son compuestos con potentes propiedades antioxidantes que pueden ayudar a proteger las células del daño causado por los radicales libres. Su capacidad de convertirse en vitamina A los convierte en nutrientes esenciales para la visión, la inmunidad y la salud de la piel. Incluir fuentes de beta carotenos en la dieta diaria puede promover una salud óptima y prevenir enfermedades crónicas.

2.13.2. Astaxantina

La astaxantina (3,3-dihidroxi- β , β -caroteno-4,4-diona) es un cetocarotenoide rosado sintetizado por algunas especies de algas, plantas, bacterias y hongos. La astaxantina tiene 13 dobles enlaces conjugados como enlaces simples y dobles alternados para conferir a la molécula una fuerte capacidad antioxidante para neutralizar los radicales libres o eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS). Por tanto, se utiliza como nutracéutico para la salud humana. Por ejemplo, la astaxantina se aplica como agente protector contra enfermedades asociadas a radicales libres, incluidos cánceres orales, de colon y de hígado, enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis y enfermedades oculares degenerativas como las cataratas.

Además, la astaxantina (figura 7) se utiliza como colorante en la acuicultura para impartir pigmentación roja. El mercado comercial de astaxantina está dominado por la astaxantina sintética. El valor total de mercado de la astaxantina supera los 240 millones de dólares al año. El coste estimado de producción es de unos 1.000 dólares por kg, mientras que el precio de mercado de la astaxantina está por encima de los 2.000 dólares por kg.

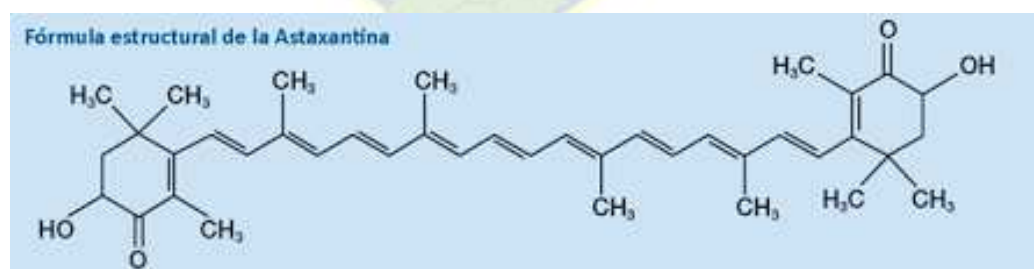


Figura 7 Estructura de la Astaxantina

Fuente: Lambertz Espanola 2024, Astaxantina, uno de los antioxidantes más potentes de la naturaleza, <https://lamberts.es/art-dsp/astaxantina-uno-de-los-antioxidantes-mas-potentes-de-la-naturaleza/>

2.14. FOTOBIOREACTORES

Un fotobiorreactor es una unidad de cultivo, ya sea cerrado o con poca exposición a la atmósfera, que es considerado como un sistema desarrollado para la producción de microalgas, especialmente porque es posible controlar las variables físicas y químicas del cultivo.

Es contundente que la alta productividad, el menor uso de agua, mejor radiación lumínica y mezclado, la escasa pérdida de dióxido de carbono, y el control en las condiciones de cultivo son claras ventajas para el manejo de fotobiorreactores.

Existen distintos tipos de fotobiorreactores en la obtención de ácidos grasos para la producción de biocombustibles; recurren mayormente al uso de los fotobiorreactores tubulares, de placas planas y los de columna de burbujas

2.14.1. Tipos de fotobiorreactores

2.14.1.1. Fotobiorreactores abiertos

En los biorreactores abiertos, el cultivo está en contacto directo con el medio ambiente. Las principales ventajas de los biorreactores abiertos son su bajo costo, su sencillez de funcionamiento, su bajo consumo energético y la posibilidad de utilizar la radiación solar. Por lo tanto, son capaces de generar una gran cantidad de energía neta, por lo que se emplean con frecuencia en plantas industriales. En 2008, el costo unitario de la producción de *Dunaliella salina* en un fotobiorreactor abierto era de unos 2,55 euros por kilogramo de biomasa seca, lo que se consideraba demasiado elevado para justificar la producción de biocombustibles

En los biorreactores abiertos, la demanda de dióxido de carbono de las microalgas se satisface normalmente con el aire de la superficie, esta tiene una concentración aproximada de 380 ppm, aunque también se pueden instalar aireadores sumergidos para mejorar la absorción de dióxido de carbono. Los sistemas abiertos más utilizados son los estanques circulares, los estanques de canalización.

2.14.1.1.1. Estanques circulares

Son grandes estanques al aire libre que incorporan un brazo giratorio en el centro para mezclar el cultivo adecuadamente (figura 8) . A medida que el brazo giratorio se desplaza a mayor distancia, se puede obtener una mayor mezcla del cultivo en la periferia. Esta disposición se ha utilizado tradicionalmente para el cultivo de *Chlorella vulgaris* y *Chlamydomonas* sp.



Figura 8 Estanque circular abierto.

Fuente: Universidad Nacional de Cheng Kung, Tainan, Taiwán

2.14.1.1.2. Estanques de canalización

El cultivo circula continuamente alrededor de una pista de canales, manteniendo las propiedades del cultivo homogéneas y evitando la sedimentación (figura 9). El cultivo de microalgas se introduce después de la rueda de paletas y completa un ciclo mientras se airea mecánicamente con CO₂. Se lleva a cabo su cosecha antes de la rueda de paletas para así comenzar el ciclo de nuevo. El burbujeo de dióxido de carbono puede mejorar la aireación, el consumo de dióxido de carbono y la eficacia del mezclado, lo que conlleva un mayor crecimiento de las células microalgales. La rueda de paletas proporciona la circulación, un adecuado mezclado, y también evita la sedimentación. Las principales algas que se suelen cultivar en este tipo de estanques son *Chlorella* sp., *Spirulina* sp. y *Dunaliella* sp.



Figura 9 Estanque de canalización

Fuente: Desarrollo De Un Plástico Biodegradable Por Medio De La Microalga *Chlorella Vulgaris* Cultivada En Aguas Residuales Industriales, Diego Alexander Chavarro Rivero.(Chavarro Rivero Diego Alexander & Cuervo Parga Laura del Pilar, 2022)

2.14.1.2. Fotobioreactores cerrados

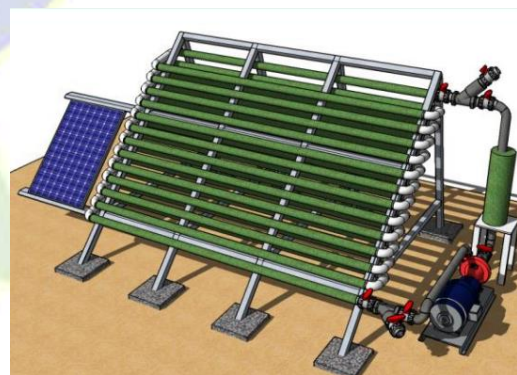
2.14.1.2.1. Fotobioreactores tubulares

Los Fotobioreactores tubulares (figura 10) son los más utilizados a escala industrial. El cultivo circula a través de un tubo o columna transparente, y es recirculado por aireación (vertical) o por bombas mecánicas (horizontal). Es esencial que el flujo sea turbulento, para evitar el asentamiento de las células en el fondo del reactor o en las zonas oscuras. Dependiendo de su orientación, los FBR tubulares pueden ser verticales (también denominados columnas) u horizontales.

El CO₂ se introduce en el reactor tubular horizontal a través de un sistema de intercambio de gases. Este tipo de FBR permite una mayor relación superficie-volumen que los verticales. Mientras que las columnas verticales deben tener un diámetro mínimo para mantenerlas estables, los reactores horizontales no tienen este requisito. Además, el ángulo de incidencia de la luz en los biorreactores horizontales es más eficiente para la captación de la intensidad de la luz. Esto también conduce a un aumento de generación de calor en el interior del cultivo. Por ello, se utilizan diferentes técnicas para evitar el sobrecalentamiento del sistema, entre las que se encuentran la pulverización de agua en la superficie de los tubos, la superposición de los tubos, la colocación de la unidad de recolección de luz dentro de una piscina de agua con temperatura controlada o la regulación de la temperatura de la corriente de alimentación o de recirculación.



(a)



(b)

Figura 10 Fotobioreactor tubular horizontal (a) y fotobioreactor tubular inclinado (b)

Fuente: Diseño de Fotobioreactores de alta eficiencia y bajo coste para el cultivo de microalgas, David Rodríguez Estupiñán.(Estupiñán, n.d.)

2.14.1.2.2. Fotobioreactores de placa plana

Estos fotobioreactores consisten en varias placas planas delgadas fabricadas con materiales transparentes (vidrio, plexiglás, policarbonato), que están conectadas en serie o en paralelo. Los espesores finos facilitan la difusión y distribución de la luz en esta distribución, aunque los biorreactores muy delgados son más caros de construir, más difíciles de limpiar y tienen más fluctuaciones de temperatura asociadas.

Se pueden clasificar en 2 categorías dependiendo de cómo se efectúe la agitación fotobioreactores con bomba y airlift (figura 11). En el caso de las bombas, la turbulencia se genera por medio del bombeo, mientras que los FBRs de tipo airlift utilizan aire comprimido para generar la potencia de mezcla. Las principales desventajas de este tipo de PBR son la dificultad de controlar el flujo, los problemas estructurales y de estabilidad de los paneles y el ensuciamiento, debido a la adhesión de las células a las paredes, reduciéndose considerablemente el área de exposición a la luz.



Figura 11 Fotobioreactor de placa plana

Fuente: Janiza Ruiz 2017, Biorreactores específicos.

https://issuu.com/jazinaruizhernandez/docs/unidad_2._biorreactores_especificos

2.14.1.2.3. Fotobioreactor de columna de burbujas (airlift)

En estas columnas, la separación del gas y el líquido tiene lugar en la superficie libre que se encuentra en la parte superior del. La transferencia de dióxido de carbono y la mezcla se hace a través de burbujas de gas procedentes de un rociador.

En este tipo de Fotobioreactor hay dos áreas interconectadas, unas aguas arriba y otras aguas abajo: la zona en la que se burbujea el flujo de gas está aguas arriba, mientras que hay otra zona que no recibe gas que está aguas abajo (figura 12). Su principal ventaja es la creación de un patrón de mezcla circular y homogéneo donde el cultivo líquido pasa continuamente a través de la fase oscura y la fase clara proporcionando efectos de luz intermitente a las células microalgas. Las principales configuraciones de los PBR de tipo airlift son bucle interno, bucle interno concéntrico y bucle externo. La configuración de bucle externo asegura una mejor mezcla debido a la distancia entre el ascensor y el descenso, lo que permite una separación eficiente del gas.

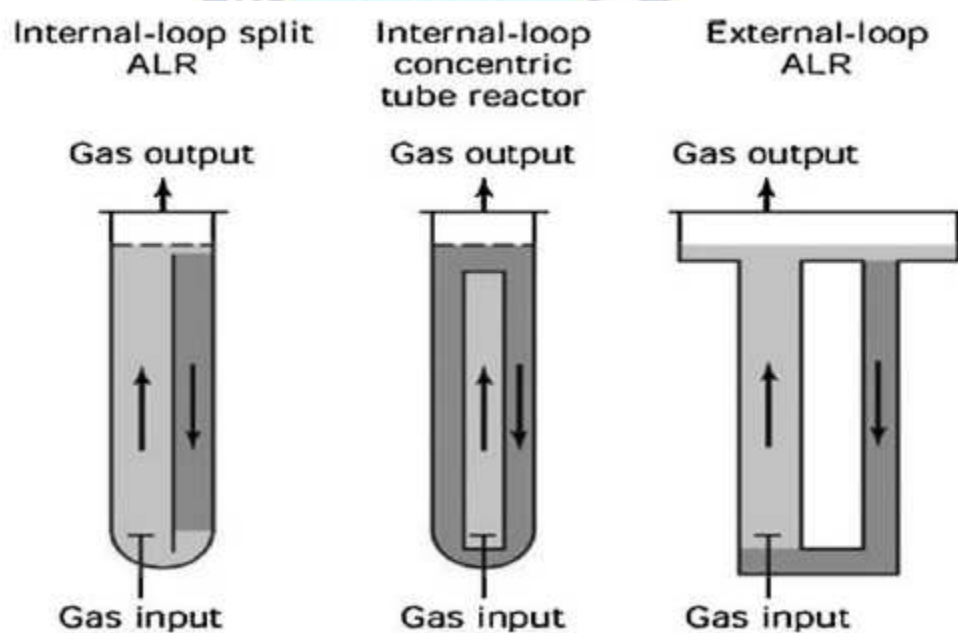


Figura 12 Diferentes configuraciones de reactor air-lift

Fuente: Diseño y Construcción de un sistema de biorreactores airlift en serie para el cultivo semicontinuos de algas, Iskra Cruz.(Cruz, 2015)

2.15. MEDIOS DE CULTIVO

Uno de los nutrientes más importantes en el crecimiento de un alga, es el nitrógeno. Algunos investigadores creen que la mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento de *Dunaliella*

salina es el NO_3Na y que fuentes de nitrógeno como las sales de amonio (acetato de amonio, nitrato de amonio, sulfato de amonio y cloruro de amonio) son fuentes menos efectivas, además esas sales de amonio a concentraciones superiores a 2.5 M pueden ser letales. Pero esas sales de amonio a bajas concentraciones en medios con buffer; estimulan el crecimiento comparado con los nitratos. Así, la reducción de nitrato requiere energía y si la energía suplementada es limitada, el mayor crecimiento ocurrirá con el amonio (Serpa Ibáñez & Calderón Rodríguez, 2006).

2.16. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo deben proveer los requerimientos necesarios para la especie que se desea cultivar en cuanto a agua, macro y micronutrientes, nitrógeno, un adecuado pH, en ciertos casos vitaminas y hormonas. Los compuestos químicos usados en la preparación deben ser de buena calidad. Las proporciones de nutrientes en el medio de cultivo son de mucha importancia para el desarrollo de las microalgas. Es necesario considerar que para que sean efectivos los medios de cultivo se debe precisar las cantidades que necesitan las microalgas para su desarrollo (Parra, 2015).

Los cultivos que se utilizaron para este proyecto fueron cultivos extensivos, controlando las variables más accesibles con cultivos mixtos.

También fue un cultivo discontinuo en el cual en el mismo fotobioreactor fue pasando las diferentes fases de crecimiento, ajustándose a una función lógica. Este produjo cambios en el cultivo conforme transcurre el tiempo de cultivo.

2.16.1. Cultivo fototropico

En este tipo de condiciones la microalga usa la luz, ejemplo la luz solar, como fuente de energía y carbón inorgánico como fuente de carbón para formar compuestos químicos a través de la fotosíntesis

2.16.2. Cultivo heterotrofico

La microalga usa una fuente de carbón orgánico y la fuente de luz como fuentes de energía. Este tipo de cultivo podría ayudar a eliminar el problema asociado con el límite de luz que ocurre cuando se producen altas concentraciones de biomasa en el fotobioreactor de una escala mayor

2.16.3. Cultivo mixotrófico

Se denomina de esta manera al cultivo en el que las microalgas realizan la fotosíntesis usando tanto la fuente de carbón orgánica como la fuente de carbón inorgánica. Lo que supone que la microalga es capaz de crecer bajo condiciones fototróficas y heterotróficas

2.16.4. Cultivo fotoheterotrófico

Bajo este tipo de condiciones la microalga requiere de la exposición a la luz para usar componentes orgánicos como fuente de carbono. El uso de este tipo de condiciones de cultivo para las producciones de biodiesel es muy raro al igual que el cultivo mixotrófico. (Cruz, 2015).

2.16.5. Medio de cultivo F/2 Guillard

La composición química de las microalgas no es constante, especialmente las que se cultivan. Los niveles en su composición dependerán del tipo y contenido de nutrientes empleados en el medio de cultivo, de la condición de la cepa de microalga, de la iluminación, temperatura, calidad de agua empleada. Anormalidad en algunos de estos factores variarán la composición química de las microalgas cultivadas (Álvarez, 1994).

Para el cultivo de microalgas marinas en la etapa de cepario e intermedio en medio de cultivo empleado es el Medio F/2 modificado (Guillard 1975), debido a que provee los requerimientos mínimos como macro y micronutrientes, vitaminas. En cultivo masivo se usa el Proline F/2 Algae Food Part A y Part B y adicionalmente metasilicato de sodio en caso de cultivo de diatomeas (Zevallos, 2010).

2.17. Cinética de crecimiento de la microalga

El proceso metabólico de las microalgas concede el incremento de su tamaño, en efecto las células se dividen y la población aumenta progresivamente. La cinética de crecimiento de la microalga consta de cinco fases: adaptación, crecimiento exponencial, crecimiento lineal, estacionaria y de muerte (figura 13). Durante la fase inicial, la microalga muestra la necesidad de adaptarse a las nuevas condiciones del cultivo y la tasa de crecimiento es cercana a cero. Posteriormente, en la segunda fase se produce una aceleración y un incremento gradual de la biomasa, de manera que existe un crecimiento balanceado. En la tercera etapa la multiplicación celular se extiende hasta que la producción de biomasa se reduce y llega a ser lineal, que corresponde a la cuarta fase, en ese sentido la población de microalgas permanece metabólicamente activa aunque el crecimiento ha cesado. Finalmente, las células mueren

debido a que culmina su ciclo y por las desfavorables condiciones del ambiente: por la ausencia de luz y nutrientes, y/o por la presencia de bacterias que han contaminado el cultivo. (Ruiz, 2015)

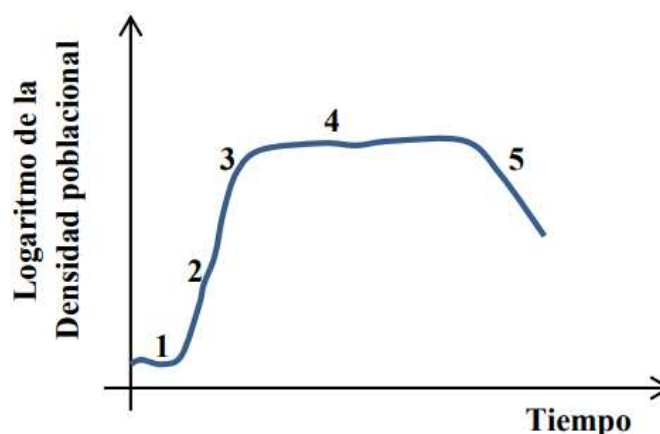


Figura 13 Curva de crecimiento cinético de la microalga (1 es la fase de adaptación, 2, fase de crecimiento exponencial, 3, fase de crecimiento lineal, 4, fase estacionaria y 5, fase de muerte.)

Fuente: Díaz, Bustos y Espinoza, (2004)

2.18. DISEÑO DE FOTOBIOREACTORES

Como se mencionó anteriormente, existen diversos factores que influyen ampliamente en el cultivo de microalgas y determinan el diseño del reactor a emplear. La baja densidad celular origina varios inconvenientes, incluyendo baja productividad, fácil contaminación, costosa recuperación del producto de medios diluidos y dificultad para el control de la temperatura en los sistemas de cultivo cerrados. Estos inconvenientes estimularon el desarrollo del fotobioreactores construidos con materiales transparentes como vidrio y policarbonato, entre otros materiales. Los primeros FBR fueron propuestos por Gudin y Chaumont (1983). En la última década los fotobioreactores tubulares y de placas planas han recibido mucha atención ya que permiten establecer cultivos de alta densidad celular, tres o más veces en comparación con los sistemas convencionales. Enseguida se enlistan las principales ventajas que ofrecen este tipo de cultivo de microalgas:

1. Facilidad para cosechar la biomasa.
2. Mantenimiento del cultivo sin contaminación.
3. Mejor control de las condiciones de cultivo.

4. Menor inversión de capital en el fotobioreactor

Este último factor es un elemento importante en el costo de producción de productos derivados de microalgas. Actualmente existen diversos tipos de fotobioreactores disponibles, entre los cuales se encuentran las columnas de burbujeo, los reactores airlift y los tanques agitados, así como los de tipo tubular y cónico (Estupiñán, n.d.). Los parámetros para el diseño de FBR son generalmente los mismos, y vienen categorizados de acuerdo según:

- Velocidad específica de crecimiento (μ). Este parámetro relaciona la concentración de biomasa con el tiempo. Indica la capacidad de generación de biomasa por cada unidad de biomasa, es decir, la cantidad de gramos de biomasa que se puede generar a partir de cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo. Matemáticamente se define como:

$$\mu = \frac{1}{C_b} \times \frac{dC_b}{dt}$$

Donde:

μ : Velocidad específica de crecimiento, tiene unidades de h^{-1}

C_b : Concentración de la biomasa

Cuando el cultivo se encuentra en condiciones de saturación de nutrientes, μ es constante e igual a la máxima correspondiente a la temperatura de cultivo. Existe una μ máxima absoluta que ocurre a temperatura óptima.

- Productividad volumétrica (P_b). La productividad volumétrica mide la cantidad de biomasa generada en la unidad de volumen del cultivo por unidad de tiempo. Las unidades serían $[g \cdot m^3 \cdot día^{-1}]$.

La ecuación que define la productividad volumétrica instantánea es:

$$P_b = \frac{dC_b}{dt}$$

Con las ecuaciones anteriores se puede deducir que:

$$P_b = \mu \times C_b$$

- Velocidad de producción de biomasa (F_b) La velocidad de producción de biomasa hace referencia a la producción total de un fotobiorreactor como caudal de biomasa. Se obtiene a partir de la ecuación:

$$F_b = P_b \times V_r$$

CAPITULO III: METODOLOGIA

3. CAPITULO III: METODOLOGIA

En este capítulo se desglosará de forma detallada la metodología, parámetros y otros factores que requieren el cultivo y extracción de microalgas. Así también los pasos a seguir para poder realizar el escalamiento de laboratorio a planta piloto.

3.1.TIPO DE INVESTIGACION

La investigación realizada es del tipo aplicada, experimental y exploratoria, este tipo de investigación está orientada en efectuar un acercamiento a un hecho de interés, con ayuda de referencia bibliográfica, obteniendo nueva información de acuerdo con la manipulación de variables involucradas en la experimentación y de este modo destacar los aspectos fundamentales de la problemática, encontrando procedimientos y parámetros adecuados para investigaciones posteriores.

3.2.TOMA DE MUESTRA

La muestra se tomó de las aguas salinas de la Laguna Colorada que se encuentra al sudeste del departamento de Potosí, en la provincia Sud Lipez a una altura aproximada de 4278 m.s.n.m. además tiene una superficie aproximada de 60 kilómetros cuadrados, una profundidad de 35cm, la temperatura varía entre -10 a 18°C, un pH promedio de 7.5 a 8.5(Hernández-Pérez & Labbé, 2014b).

Se tomo 3 litros de muestra, en 3 recipientes distintos. Se mantuvo refrigerado en recipientes aislados. Sin embargo, en los predios del IIDEPROQ se mantuvo refrigerado a 5°C.

Las aguas de la Laguna Colorada (figura 14) generalmente presentan un color rojizo naranja, esto debido a presencia de microalgas con alto contenido de astaxantina. Se ha evidenciado que el color de estas aguas varía según la época del año. Esta variación se asocia con el cambio de temperatura y la radiación solar.



Figura 14 Laguna Colorada

Fuente: Elaboración Propia

3.3. Identificación de microalgas

Para la confirmación de la presencia de las microalgas de *Dunaliella Salina* y *Hemaetacoccus Pluvialis* se realizó la observación a través del microscopio (figura 15). Estas serán confirmadas en la muestra, el cual es el indicativo para poder iniciar con la investigación.



Figura 15 Microalga *Dunaliella salina*

Fuente: Elaboración propia

3.4. Aislamiento de microalgas

El aislamiento de microalgas se hizo, pero el método de micro pipeta (figura 16), es decir, el método de disoluciones sucesivas, que se reposara una muestra de agua proveniente de la Laguna Colorada para posteriormente recolectar con ayuda de micro pipeta Pasteur las microalgas que se encuentran en la superficie de la muestra sobrenadando. Luego esta se incubará en el medio de cultivo. El aislamiento de esta muestra madre fue importante, ya que este medio de cultivo dará origen a las próximas siembras.

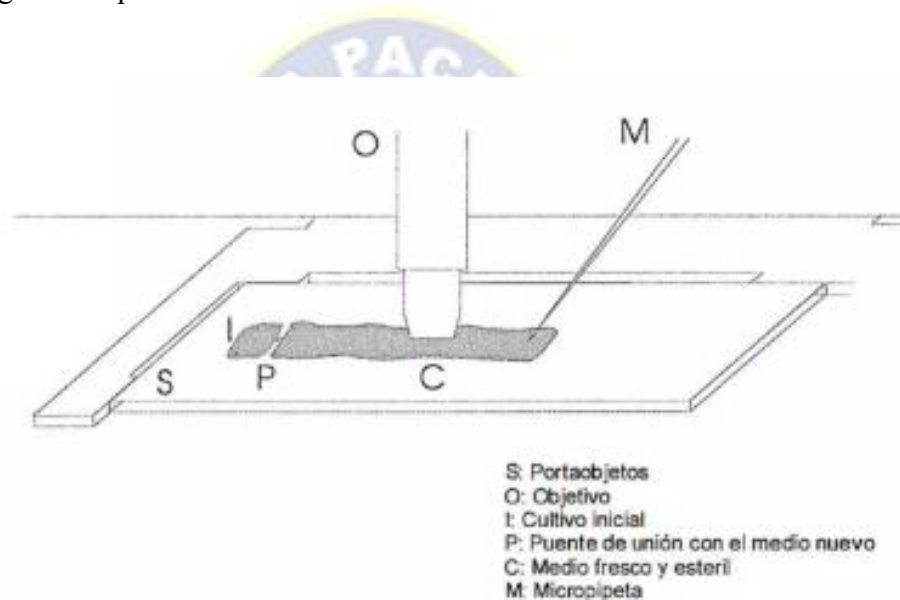


Figura 16 Aislamiento de microalgas por micro pipeta

Fuente: Abalde Alonso, (1995). Microalgas: Cultivo y aplicaciones. In *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*.

3.5. Identificación del medio de cultivo

Los cultivos que se utilizaron para el crecimiento de microalgas en este proyecto fueron cultivos extensivos, controlando las variables más accesibles con cultivos mixtos, es decir la temperatura, pH y concentración de nutrientes.

También fue un cultivo discontinuo en el cual en el mismo fotobioreactor fue pasando las diferentes fases de crecimiento, ajustándose a su crecimiento biológico. Este produjo cambios en el cultivo conforme transcurre el tiempo de cultivo.

El medio de cultivo que se utilizó fue el F2 Guillard.

Tabla 1 Medio de cultivo F/2 de Guillard

	Formula	Nombre	Cantidad(mg)
Nutrientes Mayores	NaNO ₃	Nitrato de Sodio	7.5
	NaH ₂ PO ₄ 4H ₂ O	Fosfato de sodio	0.5
	Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	Metasilicato de sodio nonahidratado	3
	NH ₄ Cl	Cloruro de Amonio	2.65
	CuSO ₄ 5H ₂ O	Sulfato de Cobre	0.98
Metales Traza	ZnSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de Zinc heptahidratado	2.2
	ZnCl ₂	Cloruro de Zinc	1.05
	CoCl ₂ 6H ₂ O	Cloruro de Cobalto hexahidratado	1
	MnCl ₂ 4H ₂ O	Cloruro de Manganeso	18
	Na ₂ MnO ₄ 2H ₂ O	Manganato de Sodio	0.63
Vitaminas	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	Cyanocobalamina	0.02
	Vitamina B	Tiamina HCl	1
	Vitamina B	Biotina	0.01

Fuente: Elaboración Propia

3.6. Identificación del medio de cultivo natural

Para el medio de cultivo natural se utilizó suero de leche de la industria “Flor de Leche S.R.L.” con las siguientes características:

Tabla 2 Características de suero de leche

Parámetro	Rango	Unidad
pH	6.6	
Densidad	1.024	g/ml

Fuente: Elaboración Propia

Para poder utilizar el suero de leche como medio de cultivo natural se utilizaron diferentes concentraciones junto con el medio de cultivo F2 Guillard descrito anteriormente, las concentraciones que se utilizaron fueron de 20, 40, 60 y 80% de concentración v/v respecto al medio de cultivo.

3.7. Caracterización de parámetros de operación del fotobioreactor

3.7.1. Fotoperiodo

Según Adolfo Sanchez 1997, se puede tomar diferentes fotoperiodos, y en todos los casos se tendrán resultados positivos en las pruebas. Sin embargo, el fotoperiodo de 12hrs día y 12hrs noche fue el que dio mejores resultados. Este fotoperiodo fue usado en el proyecto.

Para poder controlar el fotoperiodo se automatizó la fuente de luz del fotoreactor a través de internet por vía Wi-fi. Por lo que, a través de la aplicación “Magic home” y “Xiaomi home” se pudo programar las fuentes de luces para poder cumplir con el fotoperiodo aplicado a este proyecto.

Las luces led instaladas en el fotobioreactor, tuvieron que cumplir el requisito de suministrar 2400 lux.

3.7.2. pH

El pH es un parámetro independiente muy importante en el proyecto, si este no se controla puede llegar a matar a todos los microorganismos en el fotobioreactor.

Se preparó el caldo de cultivo f/2 de Guillard según la tabla 7. Este se mantuvo en un pH óptimo entre 7 y 9. Sin embargo, en el medio de cultivo natural con suero de leche se utilizó la solución tampón Tris(hidroximetil-aminometano) para poder mantener el Ph en el rango requerido.

3.7.3. Agitación

Según Coral Contreras, la agitación mecánica de al menos 10 segundos al día, puede ofrecer un crecimiento de microalgas óptimo.

3.7.4. Temperatura

La variable independiente de la temperatura se controló con ayuda de una lámpara led, se regularizó la potencia de este, con la aplicación Xiaomi home para que óptimo nos proporcionaba temperatura alrededor de los 25°C, que es la temperatura óptima para el crecimiento de microalgas según Kaplan 1986. Este foco se recubrió con material de plástico para que la luz que genera no llegue al fotobioreactor.

3.7.5. Salinidad

Con el fin de reflejar el medio de cultivo nativo de la Laguna Colorada se utilizó una concentración de 30g/L de cloruro de sodio P.A. Esto permitió el crecimiento de la *Dunaliella Salina*, pero también ayudó a la inhibición del microorganismo patógeno (Otras microalgas, protozoos, etc.) para nuestro medio de cultivo.

3.8. Conteo de microalgas

Se utilizó el método de recuento en cámara de Neubauer (Figura 17), uno de los más usados para determinar la concentración celular de las microalgas, esta cámara es una

herramienta de precisión utilizada para determinar el número de células de microalga por unidad de volumen, expresado en células por cada mililitro (cel/ml).

Para poder realizar el conteo de microalgas móviles como la *Dunaliella Salina* es necesario inmovilizarlas, es decir que se tuvo q añadir una gota de Lugol a una muestra de 2ml de cultivo para poder inmovilizar las microalgas.

Se hizo el conteo tomando una muestra del medio de cultivo, con una micro pipeta, depositándola en la cámara de Neubauer para ser llevada al microscopio óptico, en ella solamente se cuentan las microalgas presentes en las 4 zonas con cuadrulado grande. Y se utilizó la siguiente ecuación para poder determinar la concentración en el medio de cultivo.

$$\text{Concentracion celular} \left(\frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ total de células}}{N^{\circ} \text{ de cuadrantes}} * 10000 * \text{disolucion} \quad (2)$$

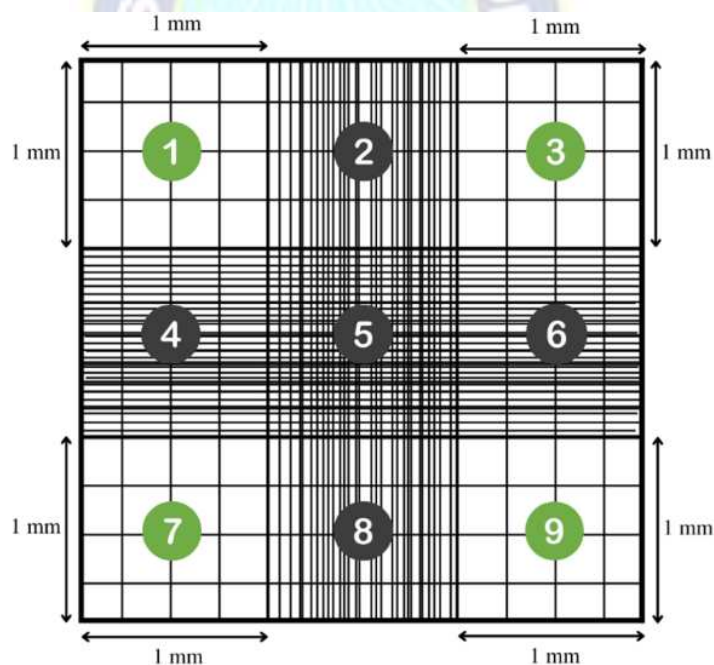


Figura 17 Cámara de Neubauer

Fuente: Cognita Conecta, Agosto 2023, Conteo celular de microalgas paso a paso, ([es.linkedin.com/pulse/conteo-celular-de-microalgas-paso-cognita-conecta.](https://es.linkedin.com/pulse/conteo-celular-de-microalgas-paso-cognita-conecta))

El conteo de microalgas por la cámara de Neubauer se realizó el conteo de las zonas 1,3,7 y 9 como se muestra en la anterior imagen. Y se utilizó la ecuación 2 para poder expresar estos datos en términos de población de microalgas.

3.8.1. Crecimiento de cultivos

Se considero las variables descritas anteriormente. Sin embargo, se utilizó fotobiorreactores batch, por lo cual el volumen del reactor se mantenía constante.

El crecimiento de cultivos para la extracción de beta-carotenos se utilizó con concentraciones de 70% de medio de cultivo y 30% de muestra con concentración de microalgas.

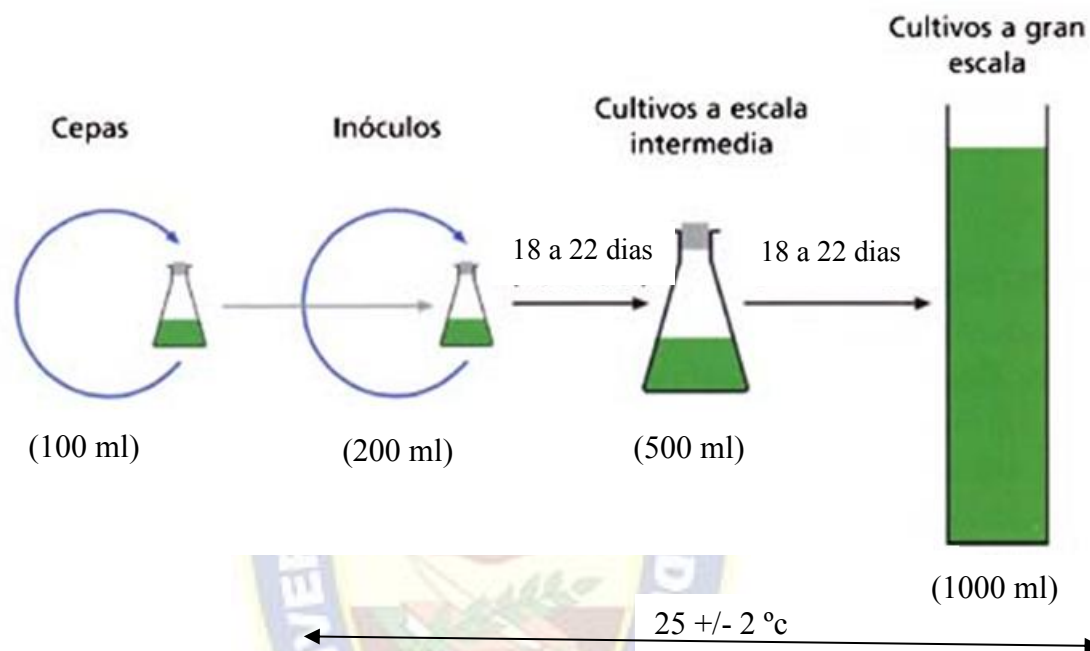


Figura 18 Crecimiento de cultivos

Fuente: Elaboración Propia

En la figura 18 se muestra el tiempo que necesito cada fotobiorreactor para poder ser incubado en fotobiorreactores de mayor volumen.

3.8.2. Determinación de clorofila

La cuantificación de clorofila en el medio, se realizó cada 3 días para así poder tener datos apreciables hasta que el medio de cultivo llegue a su estrés, generando la astaxantina. Por lo tanto, en este proyecto se utilizó el método “Tricromatico” con acetona 85% como disolvente, para la determinación de clorofila.



Figura 19 Diagrama de flujo de la determinación de clorofila método “Tricromatico”

Fuente: Elaboración Propia

Como se muestra en la figura 19, se agito el medio de cultivo y se tomó una muestra de 20ml. Para consiguiente realizar el filtrado de la muestra en un equipo de filtración de laboratorio (figura 34).

3.8.2.1. Filtración

Se filtró según el método “Tricromatico”

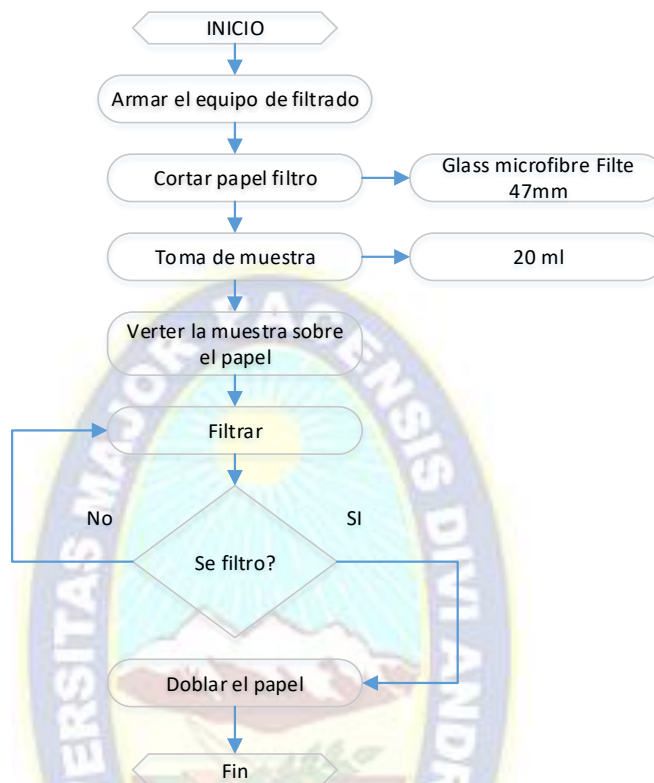


Figura 20 Diagrama de flujo de Filtración

Fuente: Elaboración Propia

Como se describe en el flujograma de la figura 20, se filtró con papel filtro $0.45 \mu\text{m}$ ya que la microalga *Dunaliella Salina* tiene un tamaño máximo de $25 \mu\text{m}$. Una vez filtrado, el papel filtro con las microalgas se llevó a un secado. En este proceso fue importante no manipular el papel filtro con las manos para no contaminarla (Nacional et al., 2008).

3.8.2.2. Secado

Después de la filtración, se realiza el secado, con ayuda de un horno eléctrico.

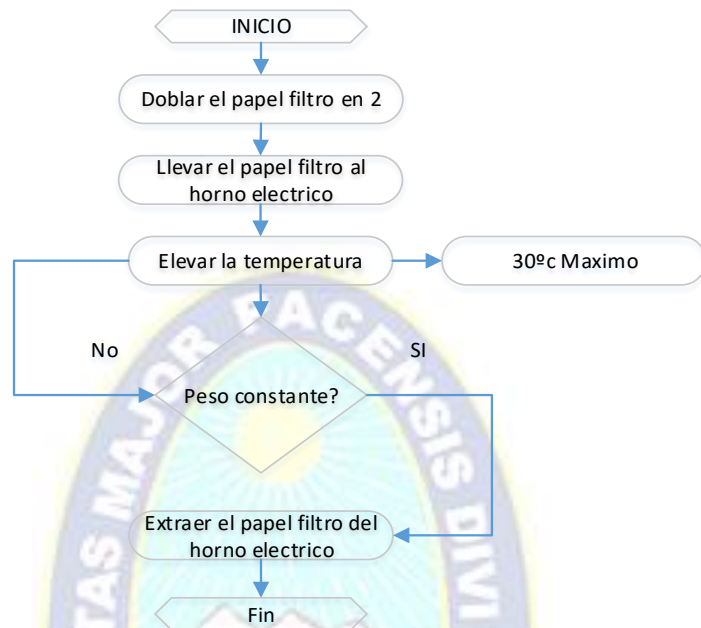


Figura 21 Diagrama de flujo del secado

Fuente: Elaboración Propia

En la figura 21 se desglosa el proceso de secado para la cuantificación de clorofila, donde se observa que el papel filtro no debe tener contacto con la luz ya que este compuesto es bastante fotosensible, además se tuvo que mantener la temperatura a 30°C como máximo.

3.8.2.3.Extracción de clorofila

Después de el secado se tiene que extraer la clorofila, esto se realizar con acetona al 85% volumen/volumen.

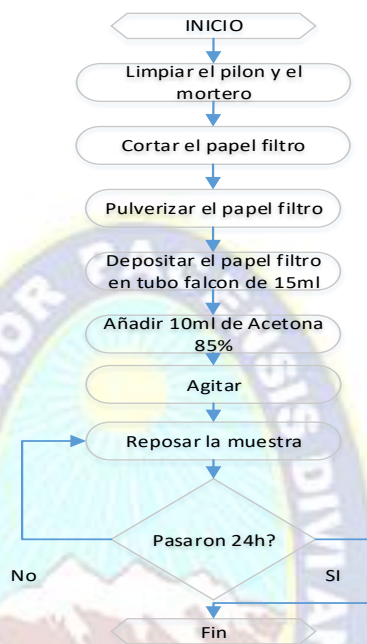


Figura 22 Diagrama de flujo de la extracción de clorofila

Fuente: Elaboración Propia

En la Figura 22 indica el proceso de pulverización y extracción que sufrió la muestra seca, Se utilizo acetona al 90% ya que según Rivera C. 2005 este es la concentración de acetona a la cual nos extrae la mayor cantidad de clorofila.

3.8.2.4. Cuantificación por espectrofotometría

La cuantificación por espectrofotometría se realizó de la siguiente manera:

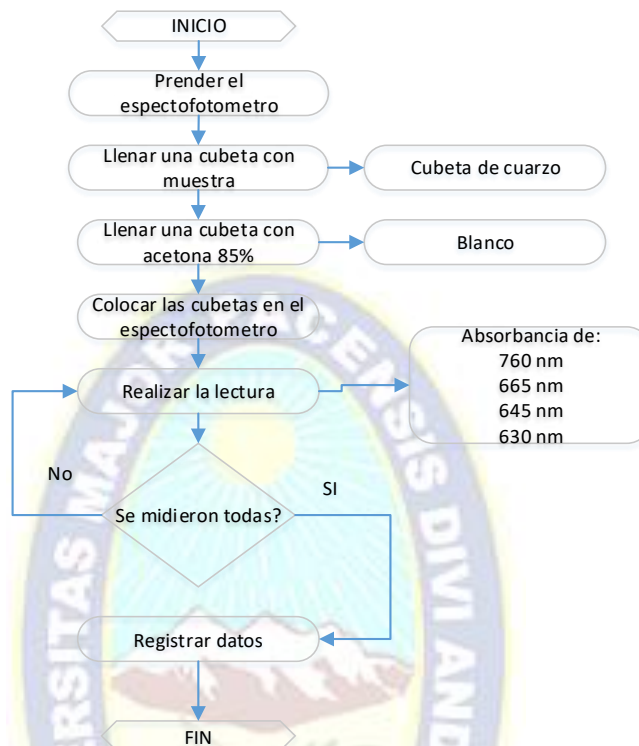


Figura 23 Diagrama de flujo de la cuantificación por espectrofotometría de la clorofila

Fuente: Elaboración Propia

La cuantificación de los pigmentos se efectuó con cubetas de 1 cm de paso de luz, a las longitudes de onda de máxima absorción siguientes: 664, 647 y 630 nm para las clorofilas a, b y c. La lectura de densidad óptica a 750 nm sirvió como corrector de la turbidez. La cantidad de pigmento fue calculada según American Public Health Association siendo la cantidad de pigmento por unidad de volumen de muestra:

$$\text{Clorofila}_a \left(\frac{\text{mg}}{\text{m}^3} \right) = \frac{Ca * V_{\text{extraido}}(l)}{V_{\text{Muestra filtrada}}(l)} \quad \text{Es la}$$

Las ecuaciones para el cálculo de las concentraciones que se usaron para el cálculo clorofilo son las siguientes:

$$Ca = 11.85 * A_{664} - 1.54 * A_{647} - 0.08 * A_{630} \quad (3)$$

$$Cb = 21.03 * A_{647} - 5.43 * A_{664} - 2.66 * A_{630} \quad (4)$$

$$Cc = 24.52 * A_{630} - 7.60 * A_{647} - 1.67 * A_{664} \quad (5)$$

Donde donde C_a , C_b y C_c , son las concentraciones de clorofila a, b y c respectivamente en el extracto, y A_{664} , A_{647} , y A_{630} son las absorbancias a las longitudes de onda respectivas (Parte, 1992b).

3.9. Cinética de crecimiento algal

Los cambios dinámicos en la biomasa de los microorganismos expuestos a sustratos, factores ambientales, factores superficiales y tiempo, con la finalidad de proporcionarnos beneficios. En este sentido se realizaron cultivos de *Dunaliella Salina* con el medio de cultivo F/2 Guillard y medio de cultivo natural. Se determinaron los parámetros de crecimiento y productividad de biomasa (Burta, 2018)

El modelado de crecimiento algal se realizó con los modelos logísticos modificado, Gompertz modificado y Baranyi-Roberts son los modelos matemáticos que más se ajustan al crecimiento de *Dunaliella Salina*. con sus respectivas ecuaciones:

Modelo logístico modificado

$$\ln \frac{X(t)}{X_0} = Y(t) = \frac{Y_{max} - Y_0}{\left\{ 1 + \exp \left[\frac{4u_{max}}{Y_{max} - Y_0} (\lambda - t) + 2 \right] \right\}} \quad (6)$$

Modelo de Gompertz modificado

$$\ln \frac{X(t)}{X_0} = Y(t) = Y_0 + (Y_{max} - Y_0) \exp \left\{ -\exp \left[1 + u_{max} e \left(\frac{\lambda - t}{Y_{max} - Y_0} \right) \right] \right\} \quad (7)$$

Modelo de Baranyi-Roberts

$$\ln \frac{X(t)}{X_0} = Y(t) = Y_{max} + \ln \left[\frac{-1 + \exp(u_{max} \lambda) + \exp(u_{max} t)}{-1 + \exp(u_{max} t) + \exp(u_{max} \lambda + Y_{max} - Y_0)} \right] \quad (8)$$

Donde:

$y(t) = \ln X(t)$, siendo $X(t)$ la densidad algal (cel.g-1) al tiempo t .

$y_0 = \ln X_0$, siendo X_0 el valor asintótico inferior y aproximadamente igual a la densidad algal inicial (cel.g-1).

$y_{max} = \ln X_{max}$, siendo X_{max} el valor asintótico superior y aproximadamente igual a la máxima densidad algal (cel.g-1).

μ_{max} = máxima velocidad específica de crecimiento (tiempo-1).

λ = tiempo de latencia (tiempo).

Se realizó la prueba de relación de los modelos de crecimiento, los valores experimentales y

modelados fueron sometidos a las métricas estadísticas: coeficiente de determinación (R^2) y error cuadrático medio (MSE, por sus siglas en inglés)(Cayré et al., 2007).

3.10. Identificación de variables de mayor influencia dentro del proceso de extracción

3.10.1. Identificación de variables

Para la selección de variables se utilizó el diagrama de Ishikawa representado en la figura 24.

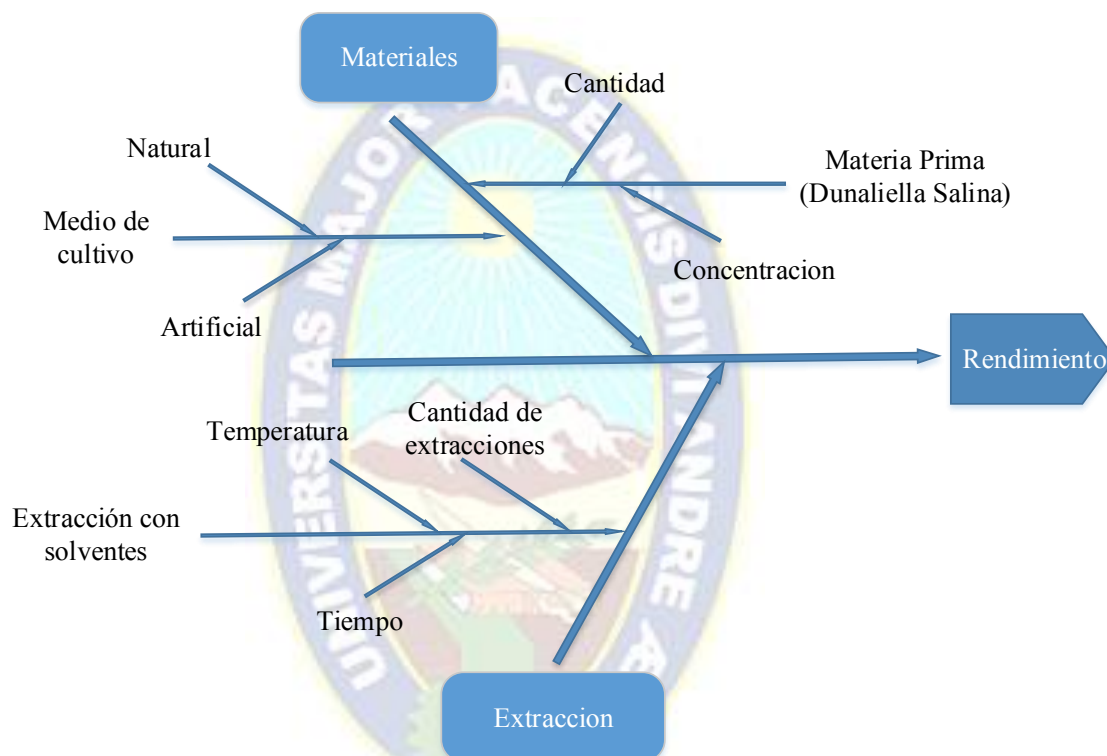


Figura 24 Diagrama de Causa y Efecto del proceso de extracción de Betacaroteno

Fuente: Elaboración Propia

Las variables independientes del proceso son las siguientes:

- Temperatura de extracción
- Radiación Luminosa
- Tiempo de extracción
- Concentración del disolvente

Antes de escalar un proceso es importante determinar las variables, ya sean dependientes o independientes, por lo tanto, los modelos de escalamiento toman en cuenta varias propiedades que se relacionan hidrodinámicas, geométricas, transferencia de luz, masa, calor y en el caso de

un fotobioreactor la concentración de la microalga. El modelo que se quiere escalar es un Reactor batch y hacer énfasis en la relación entre la transferencia de luz (Diseño et al., n.d.).

3.10.2. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL DISOLVENTE

El programa Minitab 18 proporciona el manejo de datos en función a los parámetros introducidos, los resume en una tabla que permite evaluar los efectos de los factores, el diagrama de Pareto, la gráfica media normal, las interacciones y los resultados de ANOVA.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Acetona	1	36138	36138	2.01	0.194
Metanol	1	2809	2809	0.16	0.703
Agua	1	259	259	0.01	0.907
Acetona*Metanol	1	8619	8619	0.48	0.508
Acetona*Agua	1	111038	111038	6.19	0.038
Metanol*Agua	1	17	17	0.00	0.976
Acetona*Metanol*Agua	1	1782	1782	0.10	0.761
Error	8	143556	17944		
Total	15	294000			

Tabla 3 Resultados de ANOVA

Fuente: Elaboración Propia

La tabla de Análisis de Varianza (ANOVA) indica si los efectos del modelo son significativos comparando el valor de probabilidad (p) con el valor de significancia ($f = 0.05$)

Por lo tanto, en este proceso el valor de probabilidad de los efectos de Acetona, Metanol, Agua, Acetona: metanol y Metanol: Agua son mayores que 0.05, lo que indica que no son significativos, mientras que para la interacción Acetona: Agua el valor de probabilidad es menor que 0.05, lo que significa que es significativo.

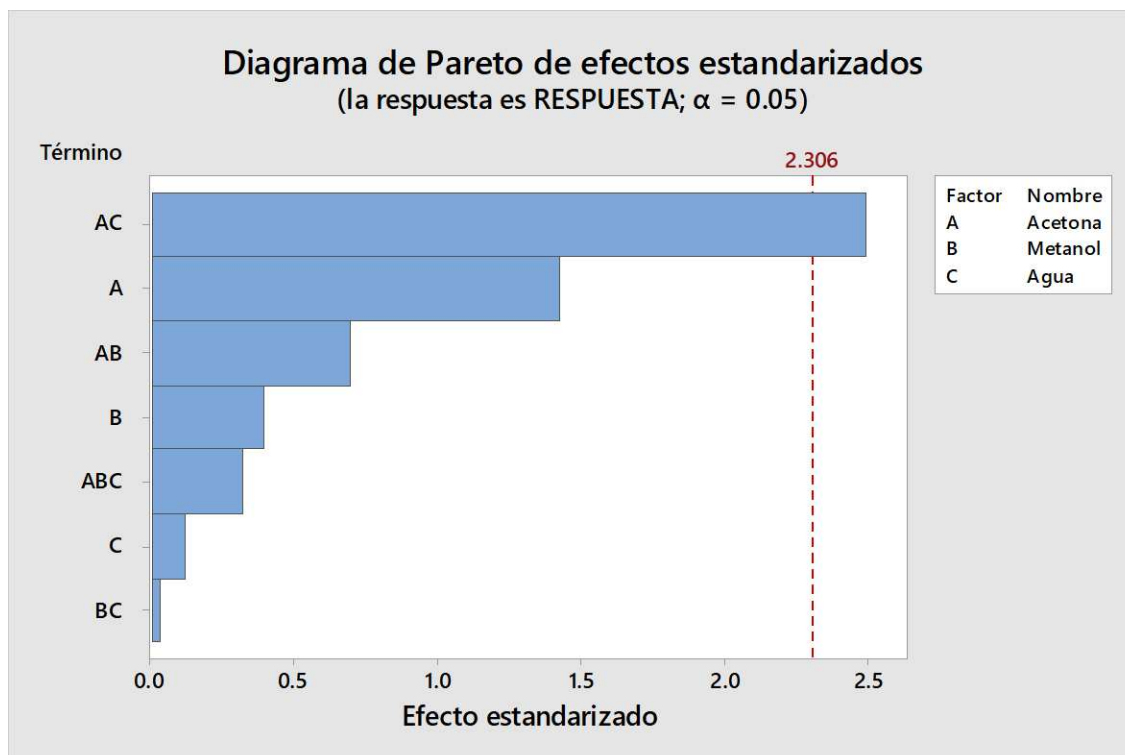


Figura 25 Diagrama de Pareto

Fuente: Elaboración Propia

El diagrama de Pareto (figura 25) representa la influencia de los factores y las interacciones de los disolventes en el proceso de extracción de betacarotenos, en la gráfica se observa que la única interacción que influye es la de Acetona: Agua, las demás interacciones no tienen mucho efecto en el proceso.

3.10.3. Ecuación del modelo ajustado

Coefficiente	Estimado
Constante	222
Acetona	0,62
Metanol	-0,7
Agua	0,59
Acetona: metanol	0,0068
Acetona: Agua	-0,0503
Agua: Metanol	0,0051
Agua: Metanol	0,0001113

Tabla 4 Coeficientes del modelo ajustado

Fuente: Elaboración Propia

Mediante el software Minitab 18 se determinó la ecuación del modelo ajustado más óptimo del proceso.

$$\text{RESPUESTA} = 222 + 0.62 \text{ Acetona} - 0.70 \text{ Metanol} + 2.39 \text{ Agua} + 0.0068 \text{ Acetona*Metanol} \\ - 0.0503 \text{ Acetona*Agua} - 0.0051 \text{ Metanol*Agua} + 0.000113 \text{ Acetona*Metanol*Agua}$$

10.3.4. Optimización del proceso

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Acetona	0	100	100
Metanol	0	100	0
Agua	0	100	0

Tabla 5 Mejor Concentración del disolvente

Fuente: Elaboración propia

La ecuación propone que las mejores condiciones de operación son cuando la concentración de Acetona es 100%.

3.11. Extracción de betacarotenos

3.11.1. Extracción en base húmeda

Se considero una alícuota de 5ml de cultivo, luego se agregó 10ml de acetona 100% en tubos falcón con una capacidad de 15ml. Se agito vigorosamente hasta por 2 minutos hasta llegar a una solución homogénea. Luego se centrifugo a 3000RPM por 7.5 min. Luego el sobrenadante se recolecto en frascos color ámbar para evitar la foto-descomposición, estos frascos se llevaron a -20°C durante 2hrs en congeladoras en los laboratorios del IIDEPROQ (Conditions & Production, n.d.).

3.11.2. Extracción en base seca

La biomasa microalgal obtenida en los fotobioreactores batch, se separó retirándolas del medio de cultivo líquido, luego se centrifugo en tubos falcón de 50ml por 3000RPM por 7.5 min. El precipitado se recolecto en cajas Petri. Se cubrió con papel aluminio estas cajas Petri para evitar la foto-descomposición. La biomasa se secó a 40°C en una estufa eléctrica hasta que el peso sea constante.

Luego la masa algal se recuperó en frascos color ámbar para evitar la foto-descomposición.

Se pesaron 100mg de microalga seca, se añadieron 5ml de acetona al 100% en tubos falcón de 15ml. Luego se agitaron por 2 min hasta llegar a un solución y color homogénea.

Seguidamente se sometió a centrifugación a 3000RPM por 5min. Los sobrenadantes se recolectaron en tubos falcón forrados con papel aluminio. Este procedimiento se repitió con el fin de extraer la mayor cantidad de betacarotenos en la muestra, es decir hasta que el sobrenadante sea transparente(Conditions & Production, n.d.).

3.11.3. Extracción por Soxleth

Para iniciar este método de extracción la masa algal debe estar seca y triturada, esto para aumentar la superficie de contacto y la cantidad de extracto.

Por lo cual se realizó los siguientes pasos

- Se peso 2g de masa algal seca, para poder ser colocada dentro del papel filtro
- Se construyo con papel filtro un cilindro, con la cantidad de masa algal dentro de ella. Este cilindro estuvo cerrado y asegurado dentro del tubo Soxleth
- El solvente fue acetona y acetona-agua. Se coloco en el balón 200ml de solvente. (volumen apropiado debe ser un poco más de la mitad de la capacidad del balón)
- Se armo el equipo Soxleth, aplicando vaselina a las juntas.
- Se realizo la extracción continua hasta que el solvente caiga en el sifón al balón. Repetir este procedimiento hasta que el disolvente que cae al sifón no tenga turbidez.
- El extracto que se encontraba en el balón de extracción se conectó al equipo para realizar una destilación sencilla donde se recupera el solvente. para futuras extracciones.
- Se llevo al secado el conjunto del cilindro del filtro y el residuo de extracción.

3.12. Cuantificación de betacarotenos

Se realizo la cuantificación de Betacaroteno por espectrofotometría. Este método llega a ser sensible, por lo que se hizo las disoluciones respectivas lo más preciso posible.

- Se preparo soluciones de 20, 10, 6, 4 y 2 ppm de patrón de betacaroteno. El mismo día que se realizó la cuantificación.
- Se peso 50mg de muestra y se diluyo en 10ml de acetona. En todo momento se cuidó de la luz, ya que el betacaroteno es fotosensible.
- Se realizo una disolución 1:10 de la muestra.
- Se hizo la lectura de absorbancia con una longitud de onda de 470nm en el espectrofotómetro. La solución blanca fue acetona P.A.

3.13. Escalamiento de laboratorio a planta piloto

3.13.1. Dimensionamiento del fotobioreactor

El escalamiento ayudo a relacionar las medidas básicas del fotobioreactor de nivel laboratorio de 1 litro de capacidad respecto al de bench scale de 50 litros de capacidad. Se emplearon consideraciones de diseño que permiten considerar variables importantes, como ser el tiempo, las dimensiones y la radiación luminosa.

Para las consideraciones del diseño del Fotobioreactor, se empezó con la especificación del riser y del downcomer. Por lo tanto, el procedimiento de cálculo inicio estableciendo desde el volumen total las dimensiones del riser

La adecuada selección del diámetro del riser, tiene un efecto significativo en las medidas del diámetro y altura del downcomer, puesto que el aumento o la disminución de estas influyen directamente en la distribución de luz dentro del FBR-ARL, los fenómenos de transferencia y la productividad volumétrica del FBR(López, 2016)

$$\frac{Dr}{Dd} = [0.3 - 0.6] \quad (9)$$

Donde:

Dr= diámetro del riser(m)

Dd= diámetro del downcomer(m)

La altura total del equipo, también relaciona el límite de este junto con el Dd

$$\frac{H}{Dd} = [3 - 6] \quad (10)$$

Donde:

Dd= diámetro del downcomer(m)

H= altura(m)

A partir de esta relación, se puede calcular el volumen total del Downcomer, la cual podemos expresar en función del diámetro teniendo en cuenta que el volumen de un cilindro se expresa de la siguiente manera.

$$A_d = \pi r_d^2 \quad (11)$$

Ordenando tendríamos que.

$$V_{Td} = \frac{\pi}{4} H D_d^2 \quad (12)$$

El volumen total del equipo se determina por la suma total del volumen total del downcomer y las tapas del equipo. El volumen de las tapas se calcula teniendo en cuenta la geometría y posición del FBR.

$$V_T = V_{Td} + V_t \quad (13)$$

Donde:

V_T =Volumen total

V_{Td} =Volumen total del downcomer

V_t =Volumen de las tapas

Según Rocio Cuao 2021 el volumen de operación a tomar en cuenta tiene que ser 70% al 90% del volumen total, es decir:

$$\frac{V_{op}}{V_T} = [0.7 - 0.9] \quad (14)$$

La relación de áreas de transferencia y relación de área superficie en el FBR influyen directamente en el crecimiento de la biomasa y en la productividad volumétrica del FBR.

$$\frac{A_r}{A_d} = \frac{\pi \frac{D_r^2}{4}}{\pi \frac{D_d^2}{4}} \quad (15)$$

$$\frac{A_T}{V_T} = \frac{2 \pi r_d (H + r_d)}{H + \pi r_d^2} \quad (16)$$

Donde:

V_T =Volumen total(m³)

A_T =Area total(m²)

R_d =Radio del downcomer(m)

3.13.2. Sistema de presión del fotobioreactor

La presión influye intrínsecamente en la agitación del medio porque puede llegar a ocasionar turbulencia y alterar la cantidad de oxígeno presente en el medio, el cual a su vez afecta la productividad de biomasa. Por tal motivo, los rangos de trabajo deben mantenerse entre los 0 y 200 kPa manométricos(Rubio Fernández et al., n.d.). Sin embargo, para un funcionamiento correcto se debió consolidar teóricamente los valores mínimos de trabajo. Se analizó la mecánica de fluidos básica del equipo, específicamente las pérdidas mayores y

menores ocasionadas por los elementos del sistema de agitación. Así, la presión de salida del reactor está dado por:

$$P_o = H_{op} \gamma_{H_2O} g \quad (17)$$

$$P_f = H_R \gamma_{H_2O} + H_T + \Delta P_d \quad (18)$$

Donde:

Pf= Presión final (KPa)

Hr= Altura del recipiente (m)

γ_{H_2O} = Peso específico del agua(kg/m³)

Ht= Perdidas de energía totales(KPa)

$\Delta P(d)$ = Perdida de carga del difusor(KPa)

La pérdida de energía totales Ht se calculó mediante como la perdida de energía del riser y del downcomer:

$$H_T = \frac{L_r}{D_r} \cdot \frac{V_g^2}{2g} \cdot f_r + \frac{L_d}{D_d} \cdot \frac{V_g^2}{2g} \cdot f_d \quad (19)$$

Donde:

L= Longitud de tubería (m)

D= Diámetro de tubería (m)

Vg= Velocidad de fluido (m/s)

f= factor de fricción (adimensional)

Para poder determinar el factor de perdida de carga por fricción, es necesario entender el número de Reynolds, que posee la ecuación:

$$Re_d = \rho v \frac{D_d}{\mu} \quad (20)$$

3.13.3. Sistema de iluminación

Se considero las variables de eficiencia en procesos biológicos, vida útil y costo, por el efecto que tienen sobre el FBR. La eficiencia en procesos biológicos, fue seleccionada por el alcance que tienen las longitudes de onda de la fuente lumínica en el crecimiento microalgal. La vida útil, porque reduce los costos de mantenimiento del sistema lumínico y el costo por el valor final de construcción del FBR. La siguiente ecuación facilita el cálculo de la potencia.

$$PI = \frac{P}{V_{op}} \quad (21)$$

Donde:

PI= Potencia lumínica

P= Potencia (Watts)

Vop= Volumen de operación (L)

Las siguientes ecuaciones permitieron calcular de manera la intensidad lumínica y la iluminación máxima del fotobioreactor.

$$\frac{F}{W} = I \quad (22)$$

$$\frac{F}{S} = E \quad (24)$$

$$C = \frac{Pt}{Pm} \quad (23)$$

Donde:

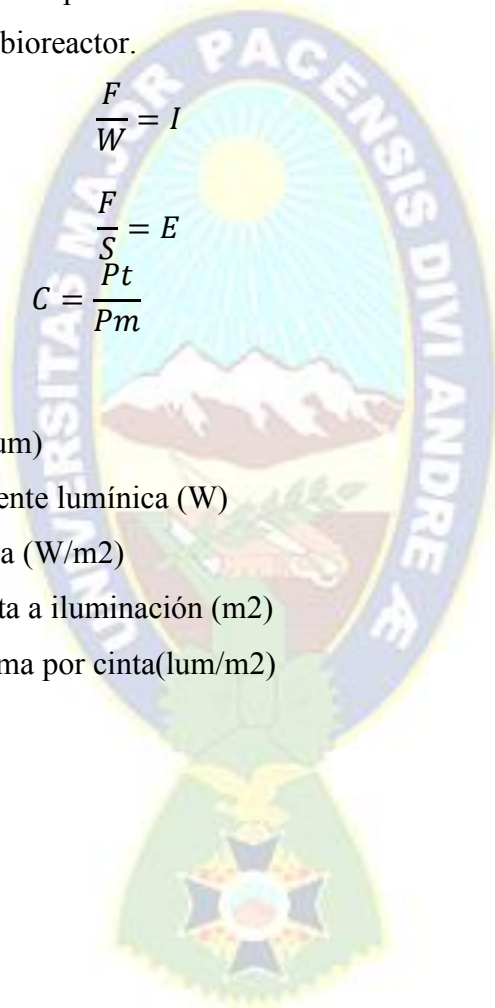
F= Flujo luminoso (lum)

W= Potencia de la fuente lumínica (W)

I= Intensidad lumínica (W/m²)

S= Superficie expuesta a iluminación (m²)

E= Iluminancia máxima por cinta(lum/m²)



CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION

4. CAPITULO IV: CALCULOS Y RESULTADOS

4.1. AISLAMIENTO DE MICROALGAS

En la Figura 25 se observa la presencia de la microalga *Dunaliella Salina* dentro de la muestra proveniente de la laguna Colorada. Observando sus morfologías esféricas características y sus antenas.

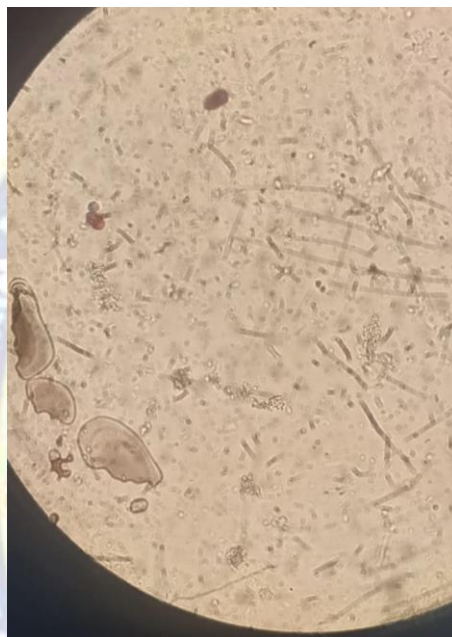


Figura 26 Presencia de la microalga Dunaliella Salina

Fuente: Elaboración Propia

En la figura 26 muestra que las microalgas se aislaron por micro pipeta, recolectando la costra de la muestra hacia un tubo falcón con medio de cultivo. Estos tubos falcón taparon con algodón para tener intercambio de gases, pero no de microorganismos.

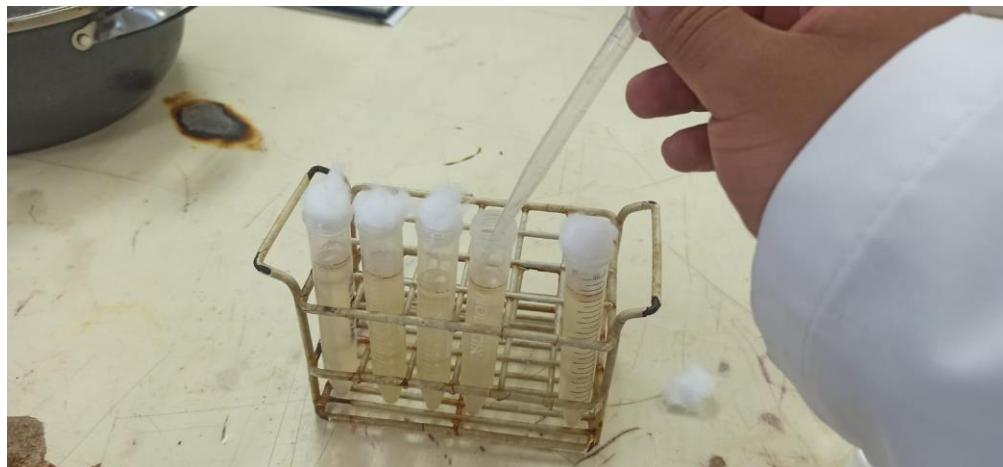


Figura 27 Aislamiento de microalgas en laboratorio

Fuente: Elaboración Propia

4.2. IDENTIFICACION DEL MEDIO DE CULTIVO

La primera etapa que realizo en el laboratorio era la valoración de algunos parámetros fisicoquímicos que posee la muestra. Para poder determinar los parámetros naturales que necesita la microalga para poder crecer.

Tabla 6 Parámetros Generales para cultivo de microalgas

Parámetro	Rango	Optimo	
Temperatura °c	16-27		
Salinidad(g/ml)	12-40		
Intensidad de luz(lux)	1000- 10000	2500- 5000	(Depende del volumen y densidad)
Fotoperiodo (luz:oscuridad, horas)	16:8(min)	24:0(max)	
pH	7-9	8.2-8.7	

Fuente: fao.org

Sin embargo, los parámetros de la muestra de microalga de la Laguna Colorada fueron los datos de la tabla 6.

Tabla 7 Parámetros naturales de la microalga Dunaliella Salina

Parámetro	Valor
Temperatura °c	17
Salinidad(g/ml)	40
Intensidad de luz(lux)	3700
Fotoperiodo (luz:oscuridad, horas)	12:12
pH	7.5

Fuente: Elaboración propia

4.3.IDENTIFICACION DE VOLUMENES DE MEDIOS DE CULTIVOS EN LOS FOTOBIOREACTORES

Para los volúmenes utilizaron en los fotobioreactores se utilizaron los datos de la tabla 12.

Tabla 8 Volumen de fotobioreactores

Volumen total(ml)	Volumen de Medio Cultivo (ml)	Volumen Muestra(ml)
200	150	50
500	350	150
1000	700	300
3000	2100	900

Fuente: Elaboración Propia

La tabla 8 indica los volúmenes considerando que el medio es totalmente artificial, por lo que, en este proyecto se utilizó medio natural tomando en cuenta el suero de leche en concentraciones ya descritas.

Tabla 9 Volumen de medio de cultivo Natural

Volumen total(ml)	Volumen de MC(ml)	Con. suero leche %v/v	Volumen Suero de leche(ml)	Volumen Muestra(ml)
200	125	20	25	75
	90	40	60	
	60	60	90	
	30	80	120	
500	280	20	70	150
	210	40	140	
	140	60	210	
	70	80	280	
1000	560	20	140	300
	420	40	280	
	280	60	420	
	140	80	560	
3000	1680	20	420	900
	1260	40	740	
	740	60	1260	
	420	80	1680	

Fuente: Elaboración Propia

La tabla 9 indica los volúmenes utilizados para fotobioreactores con medios de cultivos naturales, utilizando suero de leche como alternativa natural.

4.4. CARACTERIZACION DE PARAMETROS DE OPERACIÓN DEL FOTOBIOREACTOR

4.4.1. Ph

En la Figura 27 se puede apreciar el comportamiento del pH en los medios de cultivo.

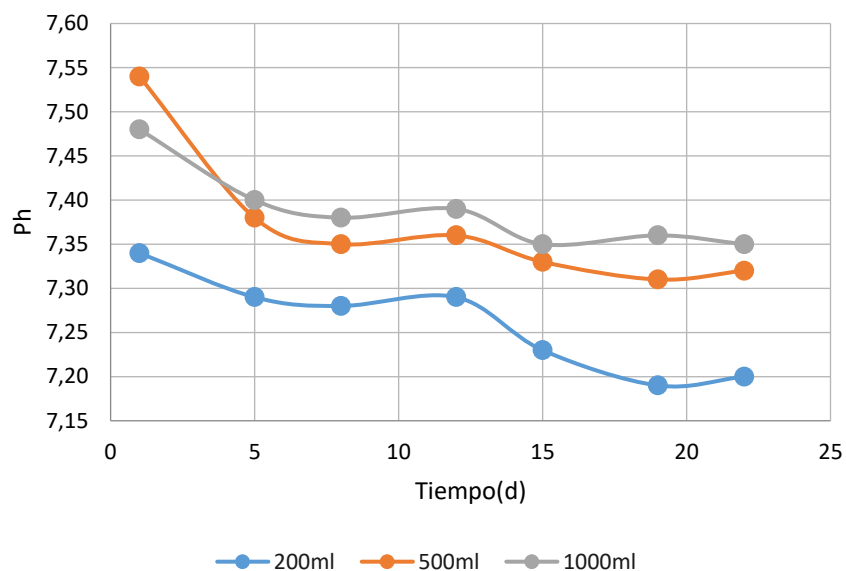


Figura 28 Ph vs tiempo MA

Fuente: Elaboración propia

El comportamiento que demuestra la Figura 21 casi constante del pH en los medios de cultivo entre los parámetros de 7 a 9, aseguraron un crecimiento adecuado en las microalgas en el medio de cultivo artificial

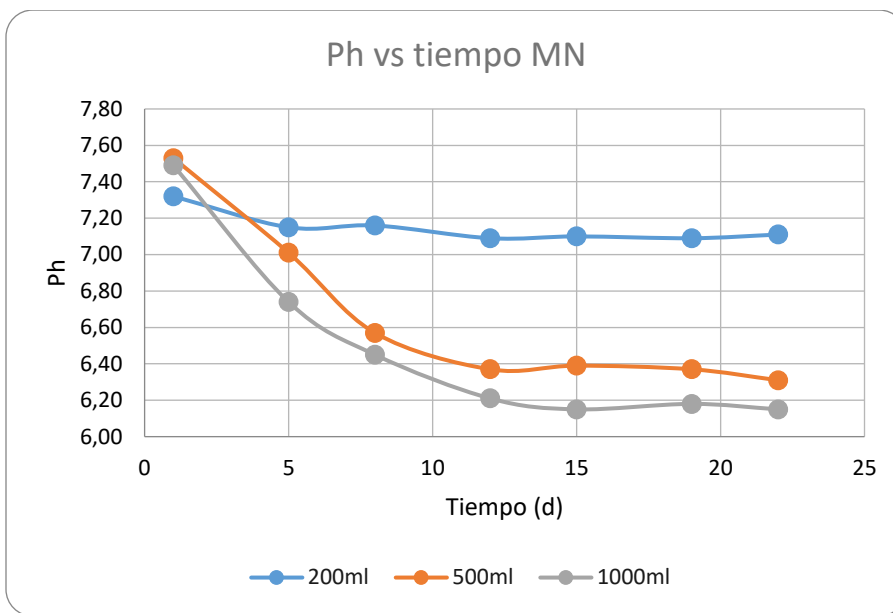


Figura 29 Ph vs tiempo MN

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 28 se puede observar que alrededor del día 5 el Ph del medio de cultivo natural tiene un descenso precipitado, justificando la muerte de las microalgas en ese periodo, donde a Ph menor de 7 la microalga *Dunaliella Salina* muere.

4.4.2. Agitación

La agitación se realizó en forma de ocho, por cada muestra un tiempo aproximado de 10 segundos, asegurándose la homogenización de la muestra.

4.4.3. Temperatura

La temperatura se midió cada dos días, pudiendo asegurarse que la temperatura se encuentra en un valor de 25 ± 2 °c. Estos datos están demostrados en la figura 29.

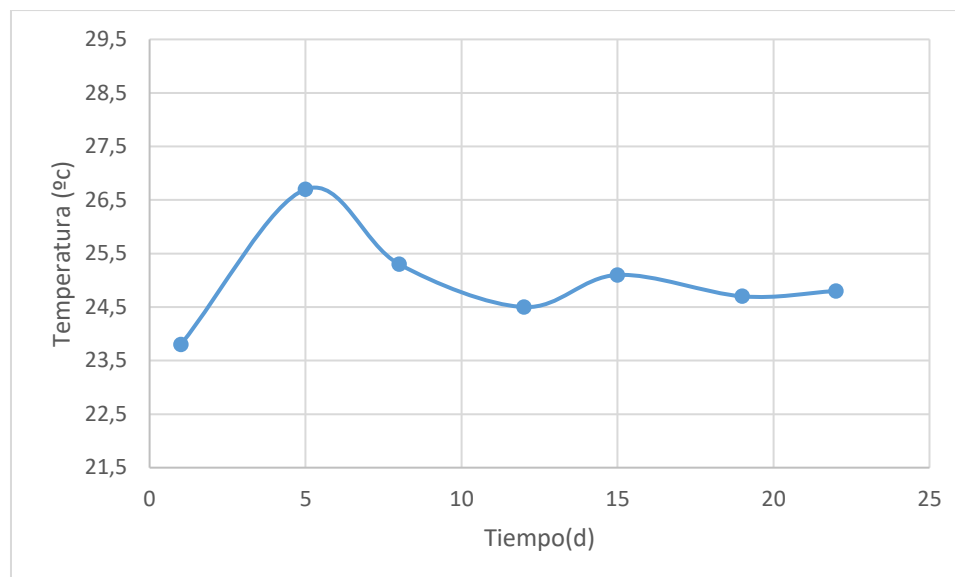


Figura 30 Temperatura vs tiempo

Fuente: Elaboración Propia

4.4.4. Salinidad

La salinidad se pesó según la cantidad que se necesita para los diferentes medios de cultivo.

Tabla 10 Cantidad de Sal en el medio de cultivo

	Muestra	%sal	Cantidad de sal(g)
Medio Artificial	200ml	3%	6.1229
	500ml	3%	15.0329
	1000ml	3%	30.0126
Medio Natural	200ml	3%	6.1229
	500ml	3%	15.0235
	1000ml	3%	30.0321

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 10 se puede apreciar la cantidad que se utilizó para la preparación de los diferentes cultivos. Las cantidades fueron asignadas según la concentración de la laguna colorada.

4.5. CONTEO DE MICROALGAS

En la Figura 30 se observa el conteo de microalgas en la cámara de Neubauer. Las microalgas son demasiado ágiles en su medio de cultivo, por lo que se colocó 2 gotas de lugol al medio de cultivo a analizar. Se observa los 16 campos de conteo, este conteo se realiza para cada una de las muestras

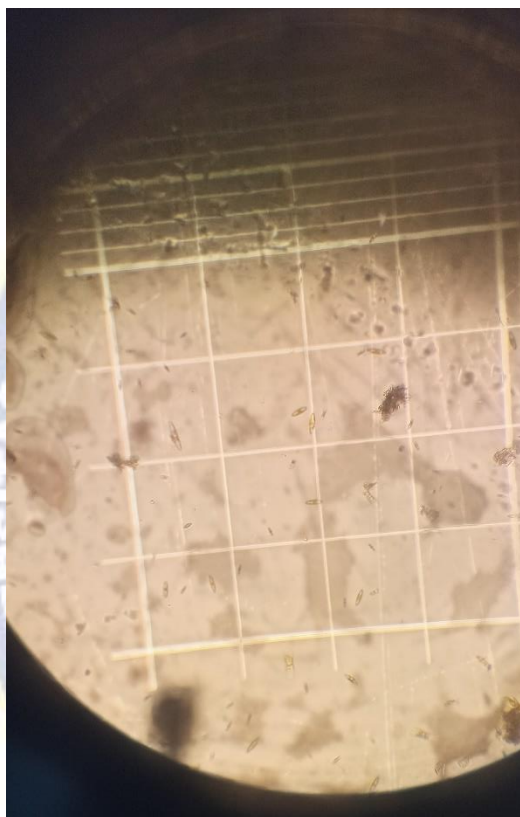


Figura 31 Conteo de microalgas

Fuente: Elaboración Propia

La muestra proveniente de la Laguna Colorada, mostraba contaminación con diferentes microorganismos no determinados, sin embargo, al realizar el conteo se pudo determinar que esta cuenta con microalgas activas.

4.6. CRECIMIENTO DE CULTIVOS

Se realizó las curvas de crecimiento de microalgas en los diferentes volúmenes de los fotobioreactores, sin embargo, el que mejor se llegó a apreciar es el de 200 ml respecto al de 500ml y 1000ml.

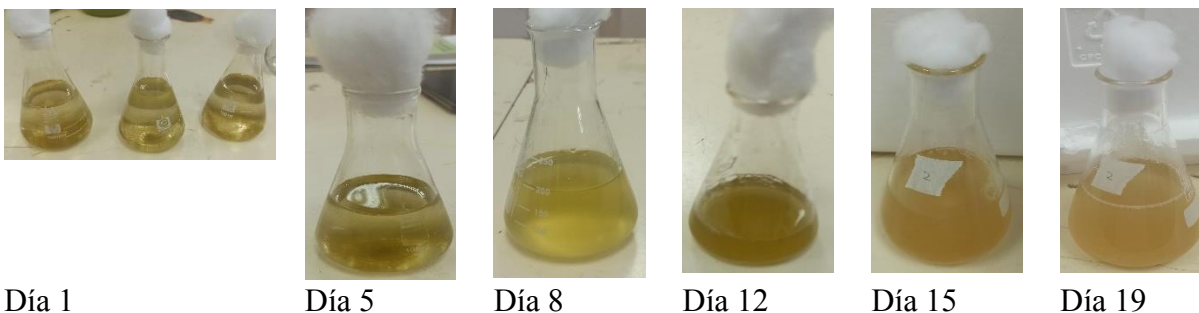


Figura 32 Crecimiento de cultivos

Fuente: Elaboración Propia

En la Figura 31 se logra apreciar el crecimiento de las microalgas en el medio de cultivo Natural, el en día de incubación, se puede corroborar que el color del medio de cultivo tiene poca turbidez, mediante transcurre el tiempo, el medio de cultivo se enriquece de microalgas *Dunaliella Salina*, dando el color verde oscuro característico de esta alga, llegando al día 12vo se encuentre en su máximo contenido de microalga en las condiciones de laboratorio, es decir cuando el medio de cultivo esta turbio. A partir de este día comienza el estrés de la microalga para producir Astaxantina, dándole su color característico Rosado.

4.6.1. Medio de cultivo artificial

Para el medio de cultivo artificial se tomaron los datos del medio F2 Guillard donde primeramente se empezó con volúmenes de 200ml, este se hizo por duplicado para poder tener datos confiables.

Para el conteo de microalgas se utilizó la cámara de Neubauer, en el cual dieron los siguientes resultados

Tabla 11 Conteo de microalgas MA

Día	200ml		500ml		1000ml	
1	6.06E+05	6.38E+05	2.63E+05	2.31E+05	2.75E+05	2.63E+05
5	4.69E+05	4.25E+05	2.56E+05	2.63E+05	3.25E+05	3.56E+05
8	6.75E+05	6.75E+05	4.31E+05	3.94E+05	7.88E+05	9.69E+05
12	8.13E+05	8.94E+05	4.19E+05	4.06E+05	8.13E+05	8.94E+05
15	9.19E+05	8.00E+05	4.13E+05	3.44E+05	3.50E+05	2.56E+05
19	5.31E+05	5.44E+05	2.31E+05	2.06E+05	1.88E+05	1.44E+05
22	4.00E+05	4.75E+05	1.81E+05	1.94E+05	7.50E+04	6.25E+04

Fuente: Elaboración Propia

Estos datos fueron obtenidos con el conteo en la cámara de Neubauer, donde se tomó las 4 áreas y se hizo su respectivo tratamiento para poder expresarlas en concentración de celular por ml.

Seguidamente para poder entender el comportamiento que tienen estas microalgas se realizó la Figura 32 de crecimiento.

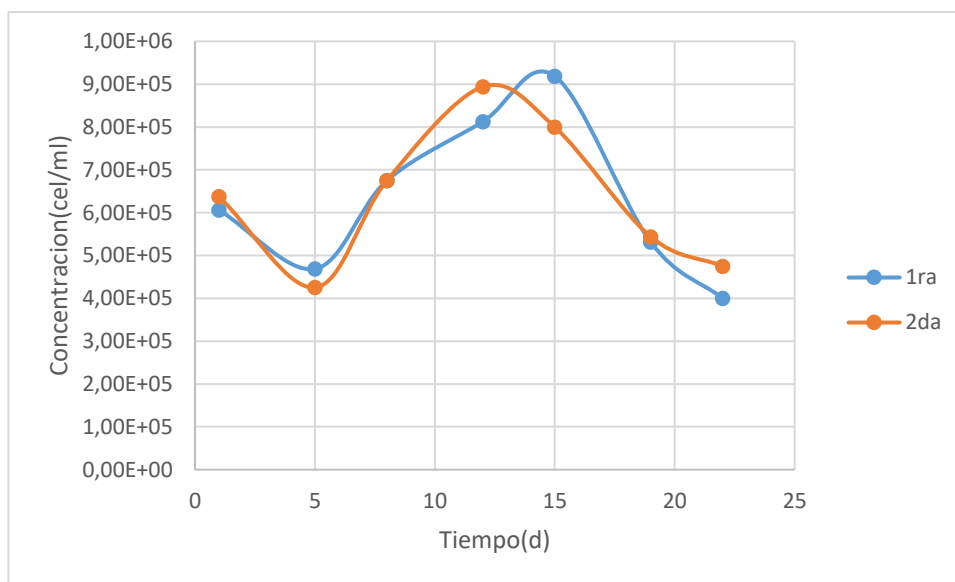


Figura 33 Crecimiento de microalgas Medio Artificial de 200ml de capacidad

Fuente: Elaboración Propia

En la Figura 32 se puede apreciar las 3 etapas que posee la microalga al momento de crecer, provenientes de los valores de la tabla 11, la primera etapa es la fase de inducción donde la microalga se está adaptando a ese nuevo medio de cultivo, con diferentes nutrientes, diferente temperatura. Luego se puede apreciar la fase exponencial de crecimiento donde la microalga alcanza su punto máximo de crecimiento alrededor del 12vo y 15vo día. Entonces después de este punto, la microalga empieza a envejecer y a morir, donde se llega a la última fase que sería la de declinación de crecimiento y muerte.

4.6.2. Medio de cultivo natural

Para el medio de cultivo natural se utilizó el medio de cultivo F2 Guillard y suero de leche, se comenzó con un volumen total de 200ml y luego se incubó en fotobiorreactores de 500ml y 1000ml de capacidad, se hizo por duplicado para obtener datos confiables.

En el conteo de microalgas en la cámara de Neubauer se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 12 Conteo de microalgas MN

Día	200ml		500ml		1000ml	
1	4.50E+05	3.75E+05	2.19E+05	2.19E+05	1.94E+05	1.50E+05
5	3.31E+05	2.75E+05	1.75E+05	1.75E+05	1.69E+05	1.19E+05
8	4.13E+05	4.44E+05	2.25E+05	2.25E+05	2.19E+05	1.88E+05
12	4.56E+05	5.50E+05	2.69E+05	2.69E+05	2.81E+05	2.25E+05
15	4.81E+05	4.19E+05	3.56E+05	3.56E+05	3.44E+05	3.19E+05
19	4.31E+05	3.94E+05	3.19E+05	3.19E+05	2.44E+05	2.00E+05
22	2.63E+05	1.50E+05	1.31E+05	1.31E+05	2.25E+05	8.75E+04

Fuente: Elaboración Propia

Los datos obtenidos en la tabla 12 pueden llegar a ser mejor expresados con la Figura 27.

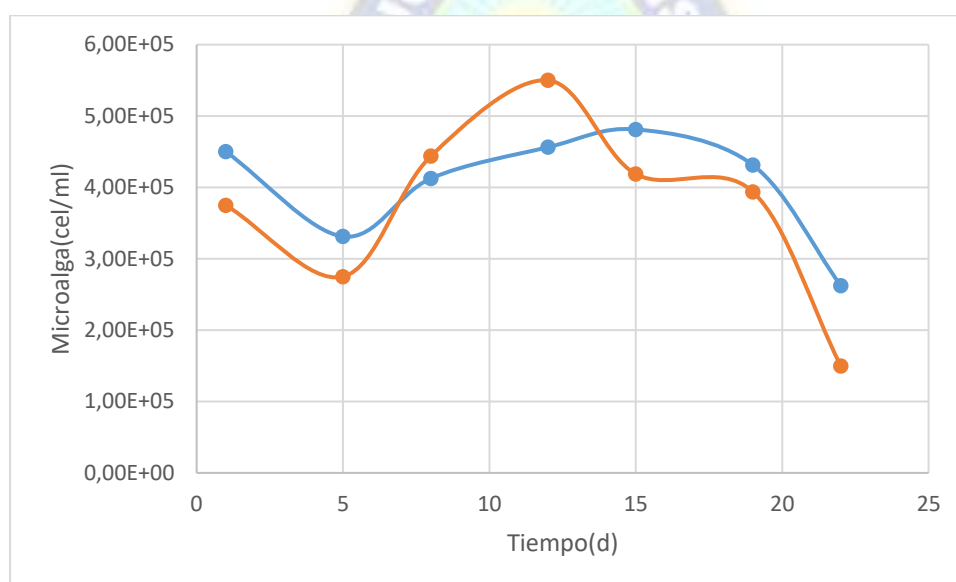


Figura 34 Crecimiento de microalgas 200ml MN

Fuente: Elaboración Propia

En la Figura 32 y Figura 33 se puede verificar que el comportamiento de la microalga es constante, es decir que alrededor del 5to día termina la primera etapa de inducción, y a partir del 8vo día empieza la 2da etapa de crecimiento exponencial, y alrededor del 20vo día empezó la última etapa de muerte de la microalga.

4.7.DETERMINACION DE CLOROFILA

4.7.1. Filtración

En la Figura 34 se observa el equipo de filtración, en la parte superior se encuentra la materia algal filtrada con su color característico.



Figura 35 Equipo de Filtración

Fuente: Elaboración Propia

El volumen utilizado para la filtración es de 20ml, el tiempo de filtrado depende de la concentración de microalga, mientras más concentrada más tiempo de filtrado requiere. El filtro que se utilizó fue de 0.45 μm .

4.7.2. Secado

La parte interna del papel filtro que contiene la muestra con clorofila es fotosensible, por lo que se envolvía con papel aluminio para poder tener una manipulación más correcta.

La temperatura a la cual se seco fue a 40°C, para que las moléculas de clorofila no se vean afectadas por la temperatura, por un lapso de 24 horas,

4.7.3. Extracción de clorofila

En la Figura 36 se muestra el triturado del papel filtro seco, eso se realizó en el mortero y pilón, lo importante de este paso era asegurarse de hacerlo bajo cantidades mínimas de luz y tratando que los trozos de papel sean los menores posibles.



Figura 36 Mortero y Pilón para pulverizar

Fuente: Elaboración Propia

En el momento de tener el papel filtro triturado con la clorofila, se deposita en un tubo falcón de 15ml, y se le agrega 10 ml de acetona al 85%. En la Figura 37 se puede observar como la acetona empieza a extraer el pigmento de clorofila. El tubo falcón se lo agita vigorosamente asegurándose que no tiene ningún tipo de fuga el tubo falcón, para después dejarlo reposar alrededor de 24hrs.



Figura 37 Extracto de Clorofila

Fuente: Elaboración Propia

Es importante almacenar las muestras de clorofila en un lugar donde llegue la menor cantidad de luz, ya que la clorofila es fotosensible.

4.7.4. Cuantificación por espectrofotometría

La cuantificación de clorofila en el medio de cultivo también es un parámetro de control de crecimiento, por lo que a lo largo del crecimiento también se analizó el contenido de clorofila el día 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21 para tener una curva representativa.

4.7.4.1. Medio de cultivo artificial

En la tabla 13 se puede apreciar los datos obtenidos en el espectrofotómetro a las diferentes longitudes de onda. Sin embargo, con ayuda de las ecuaciones (3), (4), (5) y (6) se puede calcular la concentración de clorofila A, la cual es la más importante para poder describir la concentración de clorofila total en el medio de cultivo

Tabla 13 Clorofila en Medio Artificial de 200ml de capacidad

Día	Longitud de onda				Ca(mg/m3)
	630	647	664	750	
1	0.065	0.058	0.081	-0.006	0.432665
4	0.077	0.072	0.105	0	0.563605
7	0.154	0.163	0.175	0.075	0.905205
11	0.231	0.233	0.295	0.144	1.559225
14	0.221	0.227	0.265	0.123	1.386495
18	0.153	0.16	0.176	0.021	0.91348
21	0.12	0.123	0.144	0.034	0.75369

Fuente: Elaboración Propia

En la Figura 38 se puede apreciar el comportamiento de la clorofila respecto al tiempo en el medio de cultivo artificial, teniendo un comportamiento característico para microalgas, sin embargo, los resultados de cantidades de clorofila son menores a las esperadas.

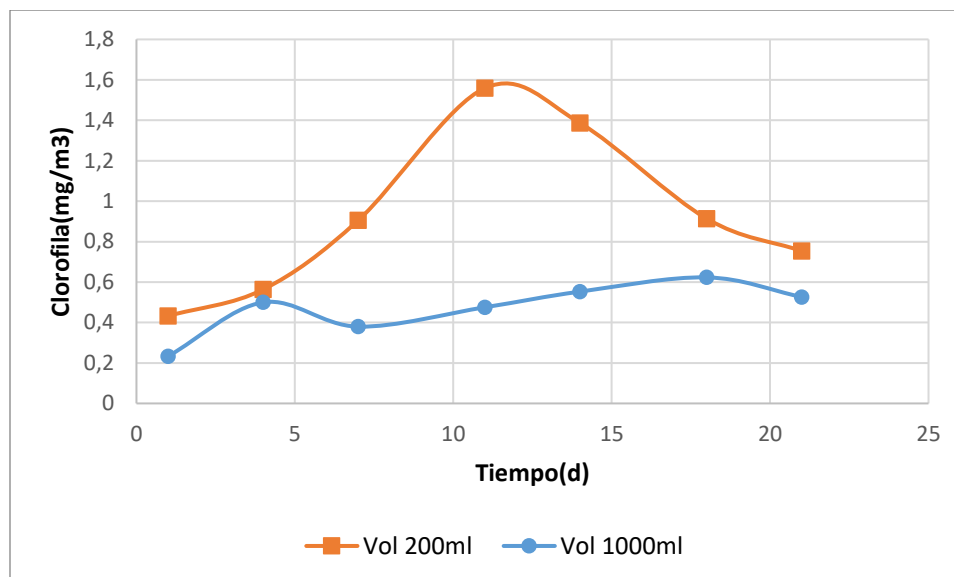


Figura 38 Clorofila vs tiempo Medio Artificial

Fuente: Elaboración Propia

Además, en la Figura 38 se puede observar que el medio de cultivo de 200ml tiene una concentración mayor de clorofila respecto a la de 1000ml y a la de 500ml. Sin embargo, los 3 medios de cultivo muestran comportamientos similares.

4.7.4.2. Medio de cultivo natural

En la tabla 14 se puede apreciar las lecturas de las longitudes de onda del espectrofotómetro, en este caso como el medio de cultivo tiene la presencia de suero de leche, la generación de clorofila a partir de las microalgas disminuye así también como su concentración.

Tabla 14 Clorofila en Medio Natural en 200ml de capacidad

Día	Longitud de onda				Ca(mg/m³)
	630	647	664	750	
1	0.037	0.028	0.058	-0.002	0.32061
4	0.053	0.058	0.125	0.003	0.693845
7	0.095	0.128	0.109	0.063	0.543465
11	0.169	0.158	0.185	0.079	0.967705
14	0.201	0.219	0.236	0.093	1.22163
18	0.137	0.153	0.169	0.071	0.878035
21	0.125	0.143	0.147	0.052	0.755865

Fuente: Elaboración Propia

En la Figura 39 se puede apreciar el comportamiento de la clorofila a en mg/m³, con los valores extraídos de la tabla, a comparación de la Figura 32 estos valores poseen un comportamiento similar, sin embargo, la magnitud de estos valores es menor.

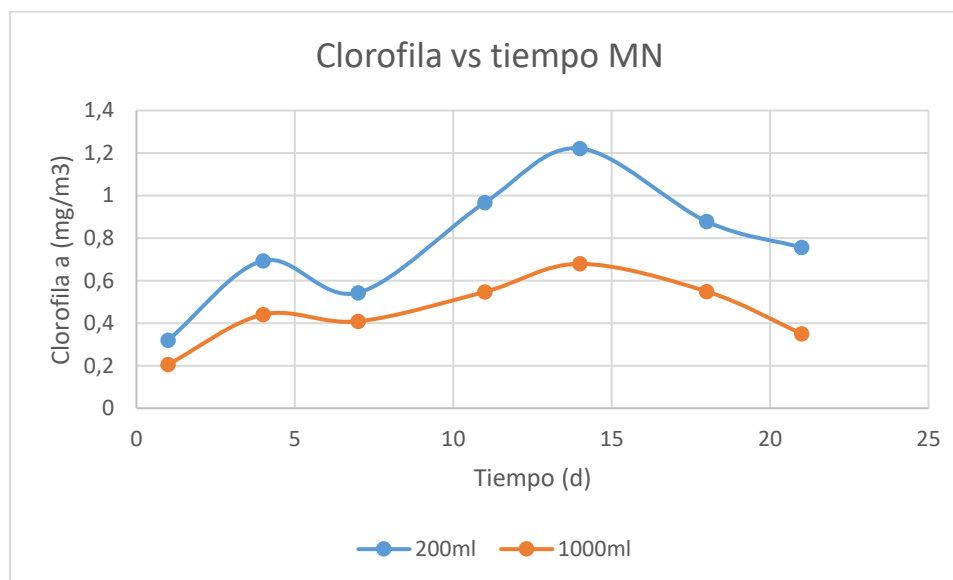


Figura 39 Clorofila vs tiempo MN

Fuente: Elaboración Propia

4.8. CINÉTICA DE CRECIMIENTO ALGAL

4.8.1. Medio de cultivo artificial

La curva de crecimiento de las microalgas, generalmente poseen cinco fases en el tiempo, la duración de estas fases puede acortarse o alargarse, llegando incluso a apenas reconocerse en la gráfica, normalmente estos factores dependen de la temperatura y fuente de luz.

Con ayuda de las ecuaciones (7), (8) y (9) se puede simular en las proyecciones de crecimiento de microalgas en el software “Python”, esto ayudo a anticipar el comportamiento de las microalgas para poder proyectarlas en base al tiempo y las condiciones establecidas en este proyecto.

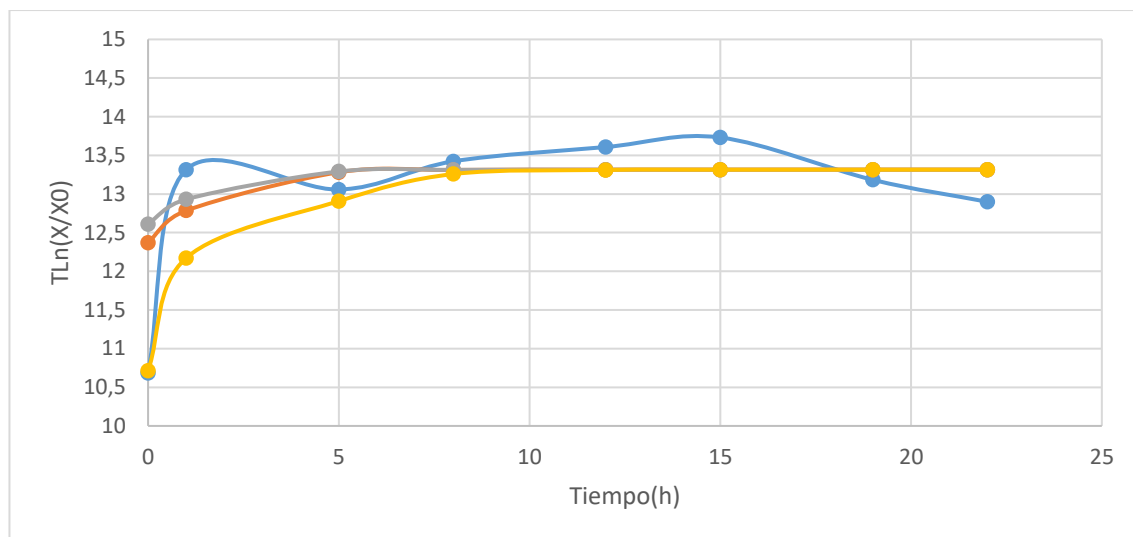


Figura 40 Ln (X) vs tiempo MA

Fuente: Elaboración Propia

Como se observa en la figura 40, las curvas de crecimiento algal se comportan similares a los datos obtenidos experimentalmente. Sin embargo, entre las 3 cinéticas algales, las que más se ajusta según los valores de R2 y error cuadrático medio de la tabla 19, es el modelo matemático de Baranyi-Roberts, ya que este considera en su modelo el tiempo de latencia que necesita la microalga.

Tabla 15 Coeficiente de correlación MA

R2 de Pearson			ECM		
Exponencial	Gompertz	Baranyi	Exponencial	Gompertz	Baranyi
0.953	0.226	0.973	3.060	3.361	0.078

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 15 se aprecia los valores de R2 de Pearson y también el error cuadrático medio (ECM) que nos indica el grado de correlación entre las curvas. La ecuación de Baranyi-Roberts es la que mejor se ajusta teniendo un valor de 0.973 de R2 y 0.078 para el ECM indicando que entre los 3 modelos matemáticos es la que mejor ajuste tiene.

Tabla 16 Hipótesis Nula MA

exponencial	Gompertz	Baranyi
0.301	0.272	0.98

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 16 se puede apreciar el valor de hipótesis nula. Los 3 modelos matemáticos presentan un valor diferente de 0 por lo cual se acepta la hipótesis nula, confinando la relación de datos respecto a los experimentales.

4.8.2. Medio de cultivo natural

El comportamiento de las microalgas en presencia de suero de leche es un poco diferente, sin embargo, no se alejan de un comportamiento normal. Con ayuda de las ecuaciones (7), (8) y (9) se pudo obtener los datos de la estimación de crecimiento algal.

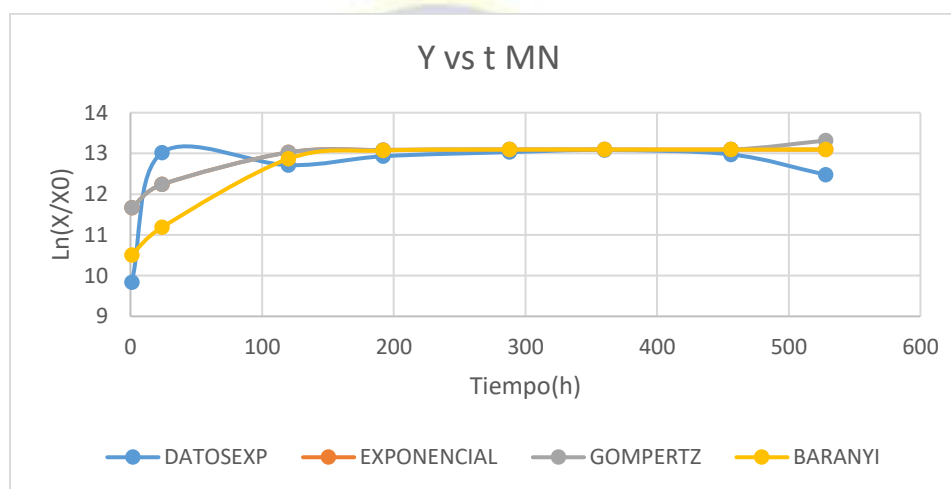


Figura 41 $\ln(X)$ vs tiempo MN

Fuente: Elaboración Propia

En la Figura 41 se puede observar las simulaciones de los modelos matemáticos de Gompertz, Exponencial y de Baranyi-Robertz. De estas tres cinéticas la que mejor se ajusta visualmente es la de Baranyi-Robertz. Sin embargo, la ecuación exponencial y de Gompertz tienen un comportamiento similar entre estas dos.

Tabla 17 Coeficiente de correlación MN

	R2 de Pearson			ECM		
Exponencial	Gompertz	Baranyi	Exponencial	Gompertz	Baranyi	
0.70855116	0.38762696	0.862997804	5.17502003	5.21323058	1.51557062	

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 17 se puede observar el valor del coeficiente de correlación que tienen las tres ecuaciones de cinética algal, en el cual la ecuación de Baranyi-Robertz tiene el valor más alto siendo 0.863, y también esta misma teniendo el valor más pequeño en el error cuadrático medio

(ECM). Por lo que, considerando estos últimos datos la ecuación de Baranyi-Robertz es la más indicada para poder predecir los comportamientos de la cinética algal.

Tabla 18 Hipótesis Nula MN

exponencial	Gompertz	Baranyi
0.308	0.265	0.98

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 18 se aprecia los valores de la hipótesis nula de las tres ecuaciones de cinética algal, donde en las tres el valor de hipótesis nula es diferente de cero. Por lo tanto, la hipótesis nula se acepta, concluyendo que los datos extraídos de los modelos matemáticos tienen relación con los experimentales.

4.9. EXTRACCION DE BETACAROTENOS

4.9.1. Extracción en base seca

En la tabla 19 se puede apreciar la cantidad de microalga que se puede recuperar por el proceso de secado de 1000ml de medio de cultivo

Tabla 19 Secado de microalga

Recipiente con muestra	Recipiente sin muestra	Recipiente después del secado	Microalga (g)
51.4122	82.6895	71.6283	11.0612

Fuente: Elaboración Propia

El rendimiento de obtención de masa algal es alrededor de 11 g/l de medio de cultivo. Gonzales-Rodríguez en 2019 consiguió un rendimiento de 20.7 g/l. Sin embargo, Diaz-Lopez en 2018 logro tener un rendimiento de 22.5 g/l. Por lo tanto, el rendimiento que se obtuvo en laboratorio está cerca de estos valores.



Figura 42 Microalga seca rica en betacaroteno

Fuente: Elaboración Propia

En la figura 42 se observa el color característico de la microalga *Dunaliella Salina* antes del estrés. El color es una prueba presuntiva cualitativa que indica que esta microalga tiene contenido de Betacaroteno



Figura 43 Microalga seca rica en Astaxantina

Fuente: Elaboración Propia

En la figura 43 se aprecia el color rosado, que es una prueba presuntiva cualitativa, que indica la presencia de Astaxantina teniendo el color rosado característico de la microalga *Dunaliella Salina* después de someterse a estrés.



Figura 44 Extracción base seca MA

Fuente: Elaboración Propia

En la figura 44 se observa la extracción de betacaroteno de las diferentes muestras con sus respectivas solventes. Se realizó tres extracciones, ya que en esta última la turbidez de la muestra a extraer ya no fue apreciable.

Tabla 20 Extracción base seca MA

	Muestra N°	Masa de caroteno (mg)	%Extracto
Acetona-agua	1	1.4	1.32%
	2	2.2	2.04%
	3	1.5	1.38%
	4	1.6	1.60%
Acetona-Metanol	5	0.9	0.90%
	6	2.6	2.53%
	7	0.4	0.38%
	8	0.8	0.79%

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 20 se aprecia la cantidad de betacaroteno extraída por el método en base seca. Observando que el mejor disolvente es la acetona-metanol al 70/30 % respectivamente con un valor de 2.6mg/g de microalga seca. Al-Dhaheri en 2016 obtuvo un rendimiento de 12.2 mg/g de microalga seca, además Kumar-Sharma en 2017 obtuvo un rendimiento de 11.2mg/g de microalga seca.

4.9.2. Extracción por disoluciones

En la tabla 21 se aprecia las cantidades de betacaroteno extraído por los diferentes solventes después de 3 disoluciones. Siendo, el solvente de acetona pura la más eficiente en la extracción con una cantidad extraída de 500mg/l. Como segundo mejor solvente tenemos la mezcla de acetona-agua 70/30, teniendo una cantidad extraída de 340 mg/l.

Tabla 21 Extracción por disoluciones sucesivas

		Muestra N°	Volumen de muestra (ml)	Masa de caroteno (mg)	Extracto (mg/l)
Acetona-Metanol	50/50	1	5	1.2	240
	70/30	2	5	0.8	160
	90/10	3	5	1.8	300
	100/0	4	5	2.5	500
Acetona-agua	50/50	5	5	0.3	60
	70/30	6	5	1.7	340
	90/10	7	5	0.4	80
	100/0	8	5	0.6	280

Fuente: Elaboración Propia

Estos datos dieron resultados que ayudan a determinar cuál relación de solventes es la que tendrá mayor eficiencia.

4.9.3. Extracción por Soxleth

En la extracción por Soxleth se utilizó el solvente acetona pura y acetona-agua 70/30, ya que estos dos solventes fueron los que presentaron mayor eficiencia en el apartado 4.9.2.



Figura 45 Extracción Soxleth de microalga rica en betacaroteno

Fuente: Elaboración Propia

En la Figura 45 se observa el equipo Soxleth, la muestra presenta el color característico verde, el cual nos indicó la presencia de betacaroteno. Para poder realizar esta extracción se mantuvieron constantes la temperatura, y tiempo de extracción.



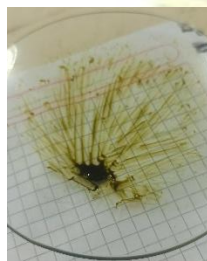
Figura 46 Extracción Soxleth de microalga rica en Astaxantina

Fuente: Elaboración Propia

En la figura 46 se aprecia la extracción Soxleth de medio de cultivo de *Dunaliella salina* con condiciones de estrés, es decir con la presencia de Astaxantina. Por estos motivos se da el color característico rosado en el balón de fondo redondo.



(a)



(b)



Figura 47 Extracto de betacaroteno rico en betacaroteno (a) y extracto de betacaroteno rico en astaxantina (b)

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 47 se muestran las cantidades de extracto obtenido con los mejores disolventes tomados de la extracción por disoluciones, acetona P.A. y acetona-agua 70/30. En la extracción con acetona Acacio N.J. 2013) obtuvo un rendimiento de 54.2% y (Romero et al., 2008) obtuvo 76.14 % de rendimiento. En el extracto del medio de cultivo artificial con acetona P.A. la mayor cantidad de betacaroteno con una cantidad de extracto de 54.83mg/g de microalga. El segundo disolvente acetona-agua 70/30 tuvo un menor rendimiento de 12.11 mg/g de microalga.

En el medio de cultivo natural, de la misma manera la disolvente acetona P.A. tuvo un rendimiento de 60.62 mg/g de microalga. Por otro lado, la disolvente acetona agua 70/30 tuvo un rendimiento de 52.21 mg/g estando cercano al valor máximo.

Tabla 22 Extracción Soxhlet

Tipo de prueba	N° prueba	Masa Microalga seca(g)	%Extraído	Extracto mg/g
Acetona-Agua(MA)	1	1.9969	1.21%	12.1187841
Acetona(MA)	2	1.7488	5.48%	54.8376029
Acetona-Agua(MN)	3	1.7597	5.42%	54.2137864
Acetona(MN)	4	2.2317	6.06%	60.6264283
Acetona-Agua(M)	5	2.6353	1.99%	19.9218305
Acetona(M)	6	3.0204	3.18%	31.8169779

Fuente: Elaboración Propia

4.10. CUANTIFICACION DE BETACAROTENOS

En la figura 48 se puede observar la curva de calibración para el betacaroteno, esto se realizó con estandar secundario de betacaroteno. La curva de calibración presenta una regresión lineal de 0.9969, por lo que podemos afirmar que la curva de calibración se realizó de forma correcta.

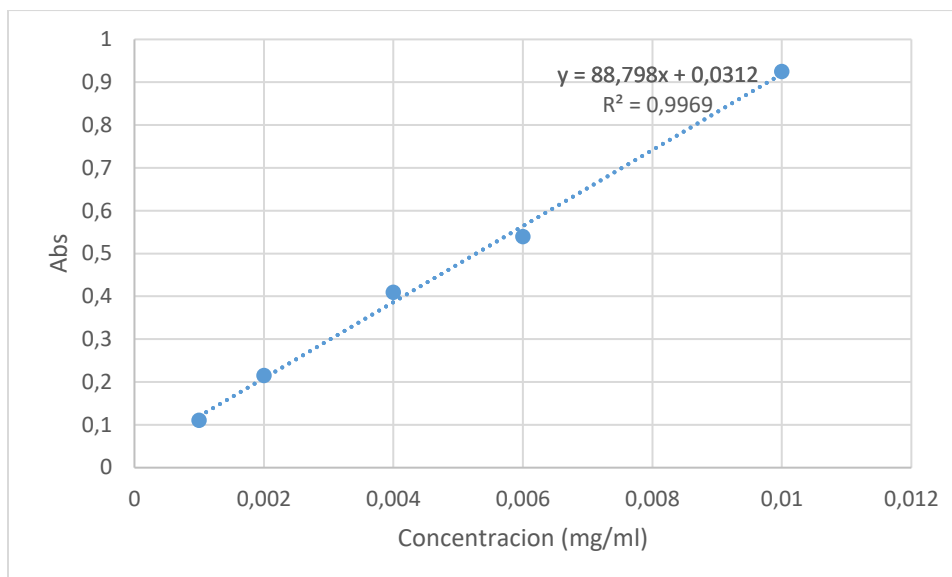


Figura 48 Curva de calibración de betacaroteno

Fuente: Elaboración Propia

En la figura 49 se puede apreciar la concentración de betacaroteno en la muestra, este se determinó con ayuda de la ecuación de la regresión lineal de la curva de calibración, dándonos una concentración de 0.00278 mg/ml

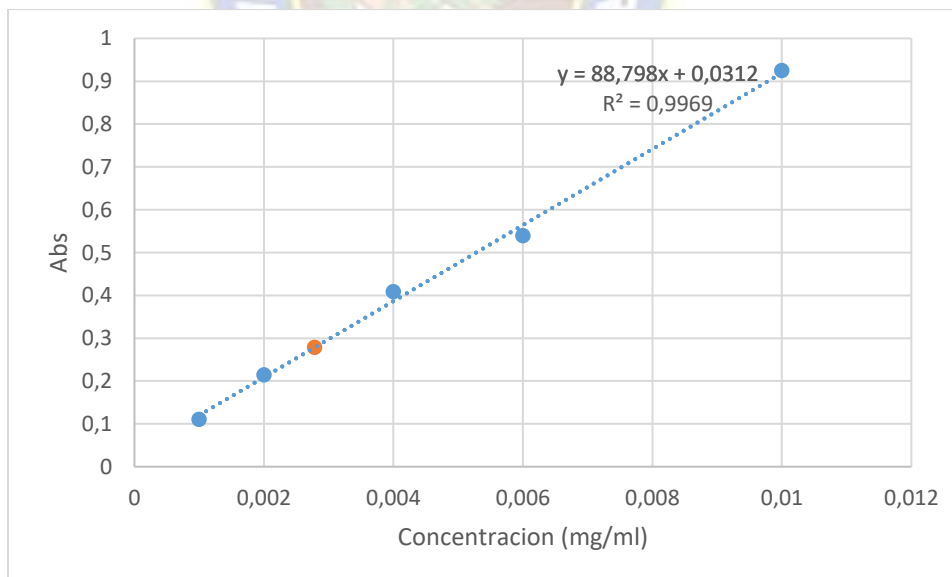


Figura 49 Determinación de la concentración de betacaroteno

Fuente: Elaboración propia

Sin embargo, la concentración de betacaroteno a nivel comercial tiene una concentración entre 5-6 mg por cada 100mg de compuesto. Entonces es necesario expresar la concentración respecto a estas unidades.

Como se hizo la dilución 1:100, con 2 diluciones sucesivas 1:10, por lo tanto:

$$0.00278 \frac{mg}{ml} * 100 = 0.278 \text{ mg/ml}$$

Este resultado muestra la concentración de la solución inicial la cual se preparó diluyendo 50mg de muestra en 10ml de disolvente.

$$0.278 \frac{mg}{ml} * 10 \text{ ml} = \frac{2.78 \text{ mg betacaroteno}}{50mg \text{ Muestra}}$$

Representando la concentración respecto a las unidades comerciales tenemos:

$$\frac{2.78 \text{ mg betacaroteno}}{50mg \text{ Muestra}} * \frac{2}{2} = \frac{5.56 \text{ mg betacaroteno}}{100 \text{ mg Muestra}}$$

4.11. ESCALAMIENTO DE LABORATORIO A BENCH SCALE

Mediante el volumen total del fotobioreactor, parámetro más importante para el escalamiento, se puede determinar los valores de sus dimensiones y requerimientos para un fotobioreactor de 50L.

4.11.1. Dimensionamiento del fotobioreactor

Conociendo el parámetro de diseño, volumen total de 50L, y con ayuda de la ecuación (14) podemos definir.

$$V_T = 50 \text{ l}$$

Otro de los valores más importantes es el volumen de operación, esto se calcula con la ecuación (15) Rubio Fernández et al., n.d. recomendando y hace uso de una relación de 0.8:

$$\frac{V_{op}}{V_T} = [0.7 - 0.9]$$

$$\frac{V_{op}}{V_T} = 0.8$$

$$V_{op} = 40 \text{ l}$$

Considerando el volumen de las tapas con el valor de 0, podemos concluir que:

$$V_T = V_{Td} + 0$$

Por lo tanto:

$$V_T = V_{Td} = 50l$$

Tomando la ecuación (11) y (13) podemos calcular de diámetro y la altura del downcomer.

$$50000cm^3 = \frac{\pi}{4} H D_d^2$$

$$\frac{H}{D_d} = [3 - 6]$$

Por lo tanto

$$D_d = 30 \text{ cm}$$

$$H = 70.73 \text{ cm}$$

Utilizando la ecuación () podemos calcular el diámetro de riser:

$$\frac{D_r}{D_d} = [0.3 - 0.6]$$

$$\frac{D_r}{D_d} = 0.6$$

$$D_r = 18 \text{ cm}$$

Seguidamente se calculó el área de transferencia y relación de superficie en el fotobioreactor con las ecuaciones (16) y (17):

$$\frac{A_r}{A_d} = \frac{\pi \frac{D_r^2}{4}}{\pi \frac{D_d^2}{4}}$$

$$\frac{A_r}{A_d} = \frac{D_r^2}{D_d^2}$$

$$\frac{A_r}{A_d} = \frac{18^2}{30^2}$$

$$\frac{A_r}{A_d} = 0.360$$

Y también:

$$\frac{A_T}{V_T} = \frac{2 \pi r_d (H + r_d)}{H \pi r_d^2}$$

$$\frac{A_T}{V_T} = \frac{2 * \pi * 15 (70.73 + 15)}{70.73 * \pi * 15^2}$$

$$\frac{A_T}{V_T} = 0.1616 \frac{1}{cm}$$

Mediante la tabla podemos observar los resultados de dimensionamiento del fotobioreactor.

Tabla 23 Variables de dimensionamiento

Parámetro	Unidad	Descripción	Resultado
Vt	l	Volumen total	50
Vc	l	Volumen del cilindro	50
Dd	cm	Diámetro del downcomer	30
Dr	cm	Diámetro del riser	18
H	cm	Altura	70.74
Vop	l	Volumen de operación	40
Hop	cm	Altura de operación	56.56

Fuente: Elaboración propia

4.11.2. Sistema de presión del fotobioreactor

Los requerimientos de la bomba para poder agitar el fotobioreactor vienen dados por la Presión final. Sin embargo, primeramente, se calculó la presión inicial con la ecuación (18):

$$P_o = H_{op} \gamma_{H_2O} g$$

$$P_o = 0.7074 \text{ m} * 997.05 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3} * 9.81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}$$

$$P_o = 0.7074 \text{ m} * 997.05 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3} * 9.81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}$$

$$P_o = 6.919 \text{ kPa}$$

Para poder determinar la pérdida de energía en los cilindros, primero tenemos que determinar el valor del número de Reynolds para cada uno. Esto se determinó con la ecuación (21):

$$Re_d = \rho v \frac{D_d}{u}$$

$$Re_d = 1.184 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} * 1.318 \frac{\text{m}}{\text{s}} * \frac{0.30 \text{ m}}{1.55 \times 10^{-4} \frac{\text{Kg}}{\text{ms}}}$$

$$Re_d = 2020.34$$

$$Re_r = \rho v \frac{D_r}{u}$$

$$Re_d = 1.184 \frac{kg}{m^3} * 1.318 \frac{m}{s} * \frac{0.15 m}{1.55 \times 10^{-4} \frac{Kg}{mS}}$$

$$Re_d = 1010.17$$

Por lo tanto, haciendo el uso del diagrama de Moody (anexo a) se encontró su factor de fricción para cada uno.

$$f_r = 0.48$$

$$f_d = 0.42$$

Con estos últimos valores se determinó la pérdida de carga por fricción total en el equipo con la ecuación (19).

$$H_T = \frac{L_r}{D_r} \cdot \frac{V_g^2}{2g} \cdot f_r + \frac{L_d}{D_d} \cdot \frac{V_g^2}{2g} \cdot f_d$$

$$H_T = \frac{1.0547 m}{0.15 m} * \frac{(1.318 \frac{m}{s})^2}{2 * 9.81 \frac{m}{s^2}} * 0.48 + \frac{1.0547 m}{0.3 m} * \frac{(1.318 \frac{m}{s})^2}{2 * 9.81 \frac{m}{s^2}} * 0.42$$

$$H_T = 0.429 m$$

Por lo tanto, el valor de la presión final está dada por la ecuación (18):

$$P_f = H_R \gamma_{H_2O} + H_T + \Delta P_d$$

$$P_f = 6.919 kPa + 0.429 m * 997.05 \frac{kg}{m^3} * 9.81 \frac{m}{s^2} + 2.05 kPa$$

$$P_f = 13.165 kPa$$

En la tabla se aprecia los resultados respecto al sistema de presión del fotobioreactor para un volumen de 50L.

Tabla 24 Variables de Presión

Característica	unidad	Resultado
Rangos mínimos de trabajo		
Presión inicial del sistema (Po)	kPa	6.919
Perdidas mayores (HI)	Kpa	4.196
ΔP(difusor)	kPa	2.05
Presión del sistema calculada(Pf)	kPa	13.165
Velocidad del gas	m/s	1.318

Fuente: Elaboración Propia

4.11.3. Sistema de iluminación

El fotobioreactor debe cumplir el requisito de lux necesarios, los valores de este son de 500-1500lux. Utilizando su factor de conversión podemos obtener:

$$PI = 2.18 \frac{W}{m^2} * \frac{1}{l}$$

Con ayuda de la ecuación (20) podemos determinar la potencia lumínica

$$PI = \frac{P}{V_{op}}$$

$$P = 34.74 \frac{W}{m^2} * 40 l$$

$$P = 87.2 \frac{W}{m^2}$$

Por consiguiente, las características de las luces led tienen de 10.8 w/m, por lo tanto:

$$C = \frac{Pt}{Pm}$$

$$C = \frac{87.2 \frac{W}{m^2}}{10.8 \frac{W}{m^2 m}}$$

$$C = 8.07 m$$

En la **Tabla 25** se aprecia el resumen del sistema de iluminación

Tabla 25 Variables de Iluminación

Parámetro	Unidad	Descripción	Resultado
P	W/m ²	Potencia	87.2
PI	W/m ² l	Potencia Lumínica	2.18
C	m	Longitud de cinta	8.07

Fuente: Elaboración Propia

4.11.4. Fotobioreactor

El modelado del fotobioreactor se realizó en el software “SolidWorks” utilizando los valores de la tabla 27. El fotobioreactor es de columna de burbujeo (airlift)

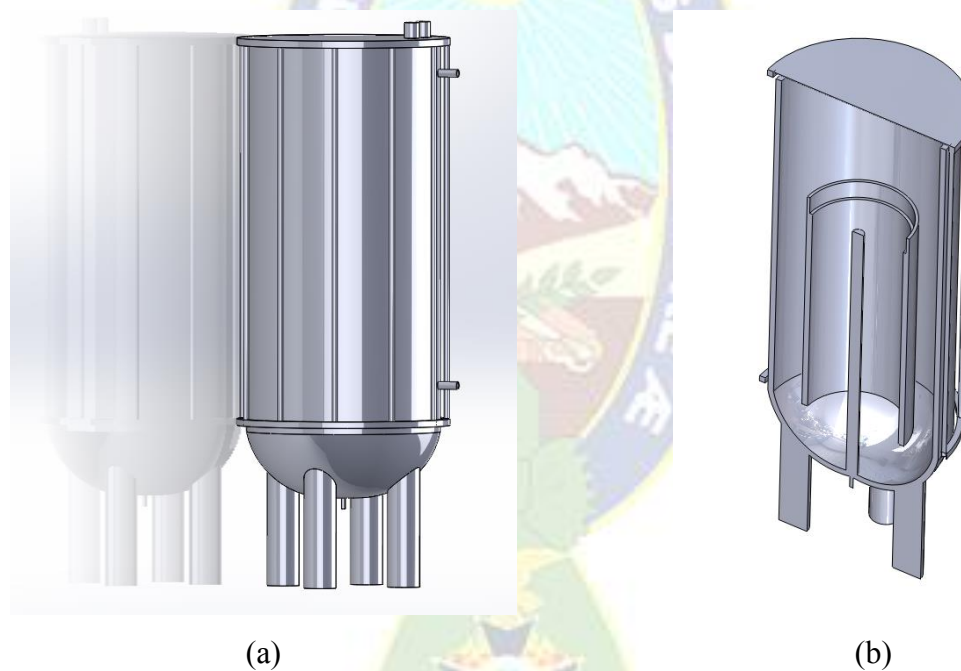


Figura 50 FBR airlift vista frontal (a) y FBR con corte lateral (b)

Fuente: Elaboración propia

En la figura se puede apreciar el modelado del fotobioreactor airlift, con los parámetros establecidos en las tablas (27) y (28), mostrando la altura del downcomer y del riser. También mostrando las 11 columnas donde se acoplarán el sistema de iluminación. También es necesario considerar los orificios de salida de la muestra, la inyección del gas y de los orificios de liberación de presión.

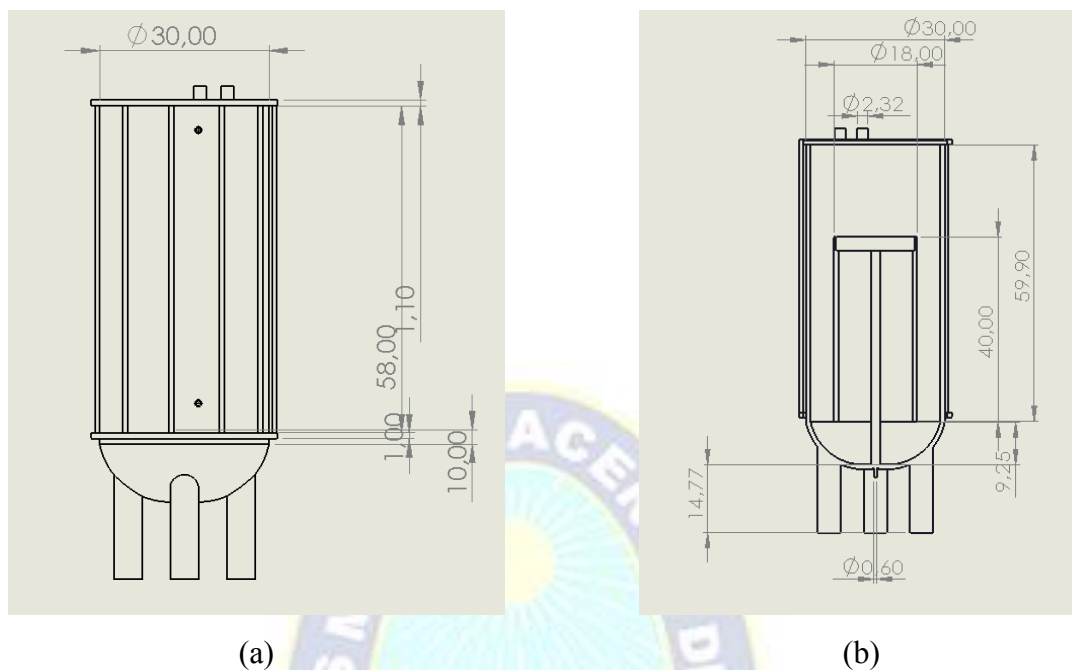


Figura 51 Plano del FBR airlift vista frontal (a) y plano del FBR airlift corte lateral (b)

Fuente: Elaboración Propia

Finalmente, en la figura 51 se puede apreciar las dimensiones del fotobioreactor airlift, este modelo fue dibujado con los datos de las tablas 23 y 25, teniendo una altura máxima de 80cm respecto al suelo. También se tuvo la consideración de proponer que este fotobioreactor se construya con materiales de acrílico transparente, esto para no tener interferencias en la transferencia de luz.

**CAPITULO V:
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

5. CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Se verifico a través del microscopio la morfología y presencia de la microalga *Dunaliella Salina*, de muestras provenientes de la laguna Colorada ubicada en el departamento de Potosí, en la provincia Sud Lipez a 4278 msnm, evidenciado concentraciones de 6.06×10^6 de microalgas por mililitro, además, y la presencia de contaminación.

La investigación se realizó en los laboratorios del IIDEPROQ, se usaron matraces Erlenmeyer de 200ml, 500ml y 1000ml como reactores batch, en la cual la temperatura y la intensidad lumínica fueron controlado con un foco incandescente y tira de luces led, El medio de cultivo, artificial y natural tienen como base el medio de cultivo F/2 Guillard, con lo cual se obtuvo un crecimiento algal óptimo según los resultados de la tabla 11 y 12 para la microalga *Dunaliella Salina*.

En el medio de cultivo Natural que consiste en el suero de leche al 20, 40, 60 y 80%, se pudo verificar la influencia del pH con la figura 27 y 28, que a concentraciones altas de suero de leche la acidificación del medio de cultivo es más rápida. Por lo tanto, en los medios de cultivo con 40, 60 y 80% es necesario introducir una solución buffer para que el cambio de pH no sea muy brusco. Sin embargo, con una concentración 20% de suero de leche, el medio de cultivo no necesita solución buffer, por lo tanto, esto indica que el crecimiento es viable en este medio de cultivo. Además, con esta concentración el crecimiento de *Dunaliella Salina* se comporta de una forma similar respecto al medio de cultivo Artificial, pero teniendo un crecimiento de menor proporción.

Se determinó la concentración de clorofila A en el medio de cultivo natural y artificial. En la Figura 39 y Figura 38, se muestra el comportamiento de la clorofila A en las muestras. Estas tienen un comportamiento similar al crecimiento de las microalgas, como se puede ver en la Figura 32 y Figura 33. Por lo tanto, la determinación de clorofila A en el medio de cultivo con el método “Tricromatico”, y el uso de un espectrofotómetro.

En esta investigación se utilizaron tres modelos matemáticos para proyectar el crecimiento algal respecto a los datos obtenidos experimentalmente en las tablas 11 y 12. La primera, el modelo logístico modificado con la ecuación que más fácil de manipular que tiene un 95 y 71% de predicción en medio artificial y natural respectivamente. Por otro lado, la ecuación de Gompertz posee un 23 y 38% de predicción en medio artificial y natural respectivamente. Por último, la

ecuación de Baranyi-Roberts posee un 97 y 86% de predicción en medio artificial y natural respectivamente. Por lo tanto, entre los tres modelos matemáticos, el que mejor predicción posee es la ecuación de Baranyi-Robertz. Seguidamente se confirmó esta conclusión con los valores de los errores cuadráticos medios (ECM) teniendo esta última ecuación el valor más bajo entre los tres de 0.07 y 1.5 en medio artificial y natural respectivamente. Además, se realizó la prueba de hipótesis para las ecuaciones, donde el software “Minitab” lanza un resultado diferente de 0 para todas las ecuaciones, aceptando esta hipótesis nula, representando que hay relación entre los valores experimentales y los valores proyectados.

Para el escalamiento teórico del fotobioreactor, se realizaron varias consideraciones, tomando en consideración un diámetro del downcomer de 30cm, resultando una altura de 70.74 cm. Además, se obtuvo un total de 11 tiras led de 70cm de largo alrededor del fotobioreactor para poder abastecer de energía lumínica al fotobioreactor. Por su parte, el Layout de un fotobioreactor se realizó con el software “SolidWorks”, en la Figura 51 y en la Figura 50 se puede observar la forma y las dimensiones del fotobioreactor armado.

La cantidad máxima de betacaroteno extraída en base seca fue 2.04 mg/100mg y 2.54mg/100mg de disolvente Acetona-agua y Acetona-metanol 70/30 respectivamente en el medio de cultivo artificial. El método de disoluciones sucesivas fue 0.5mg/100mg y 0.34mg/100mg con disolvente Acetona-agua 70/30 y Acetona-Metanol 100/0 respectivamente. En el método Soxleth se obtuvo 6.06mg/100mg con Acetona P.A. como disolvente. Además, esta última posee una concentración de 5.56 mg Betacaroteno/100mg de muestra. Alcanzando el grado comercial que posee entre 5 a 7 mg/100mg. Por lo tanto, el método Soxleth es el método más óptimo para poder producir producto rico en betacaroteno teniendo el porcentaje de extracción más alto.

El cultivo de microalgas en medio sintético y medio natural con presencia de suero lácteo, posee una gran diferencia respecto a la concentración de. Sin embargo, las microalgas salvajes provenientes de la Laguna Colorada están aptas para poder reproducirse en inmediaciones del Instituto de Investigaciones y Desarrollo de Procesos Químicos (IIDEPROQ) incluyendo sus factores ambientales. Finalmente, el método Soxleth es el más óptimo para poder extraer masa rica en betacaroteno.

5.2.RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios con diferentes medios de cultivo, en condiciones ambientales de la ciudad de La Paz.

- Se recomienda realizar pruebas con la microalga *Haematococcus Pluvialis* en laboratorio ya que estos también están presentes en la Laguna Colorada. comprobar a la eficiencia respecto a la microalga *Dunaliella Salina* en condiciones ambientales de la ciudad de La Paz.
- Se recomienda realizar un estudio de costos, ya que el producto obtenido tiene una concentración de grado comercial.



BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

- Abalde Alonso, J. E., Cid Blanco, A., Fidalgo Paredes, J. P., Torres Vaamonde, J. E., & Herrero López, C. (1995). Microalgas: Cultivo y aplicaciones. In *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Acacio N.J.; Zumalacárregui-de-Cárdenas L.M.; Ing. Johemar C. Almera J.C.; Barreno D.M.; Betancourt R.A.; Colina R.L.; R.L.; (2013). Desarrollo de un procedimiento para la extracción de β -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella* sp. en la salina Las Cumaraguas (Development of a Procedure for the Extraction of β -Carotene and Glycerol from the Microalga *Dunaliella* Sp. at L. *Revista Cubana de Quimica*, 15, 214–228. <http://www.redalyc.org/pdf/4435/443543735009.pdf>
- Alejos, H. (2017). No Titleالابتزاز الإلكتروني.. جرائم تنغذى على طفرة «التواصل». *Universitas Nusantara PGRI Kediri*, 01, 1–7.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1–4), 315–331. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01501-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01501-3)
- Burta, F. S. (2018). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. 1, 430–439.
- Castro Tapia, J. M. (2021). Efecto de reguladores de crecimiento en la producción de lípidos, proteína total soluble, clorofila y carotenoides totales en cultivos de *Scenedesmus acutus* UTEX-72 y *Chlorella vulgaris* OW-01. 1–83.
- Cayré, M. E., Vignolo, G. M., & Garro, O. A. (2007). Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas. *Informacion Tecnologica*, 18(3), 23–29. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642007000300004>
- Chavarro Rivero Diego Alexander, & Cuervo Parga Laura del Pilar. (2022). Desarrollo de un plástico por medio de la Microalga *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas residuales. 1–117.
- Conditions, C. G., & Production, A. (n.d.). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* Evaluation of Cell Growth Conditions for the Astaxanthin Production as. 19–31.
- Cruz, I. A. (2015). Diseño Y Construcción De Un Sistema De Biorreactores Airlift En Serie Para El Cultivo Semicontinuo De Algas. 52.
- Diseño, ", Construcción, Y., Un, D. E., De Biorreactores Airlift En, S., Para, S., Cultivo, E. L., & De, S. (n.d.). INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA.
- Druesne-Pecollo, N., Latino-Martel, P., Norat, T., Barrandon, E., Bertrais, S., Galan, P., & Hercberg, S. (2010). Beta-carotene supplementation and cancer risk: A systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *International Journal of Cancer*, 127(1), 172–184. <https://doi.org/10.1002/ijc.25008>
- Estupiñán, D. R. (n.d.). Cultivos abiertos (raceways) Cultivos cerrados (fotobiorreactores).

- García Estrada, R. (2014). *Separación De Microalgas Presentes En Agua Residual Tratada Del Lago Nabor Carrillo Mediante Ozoflotación*.
- García-Romeral, J., Pavía, M., García, T., Chirivella, J., & Serrano, A. (2017). Principios de biotecnología y bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistema de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *Nereis: Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, 9, 115–130.
- González, A. C. (2015). ¿Qué son las microalgas? Interés y uso. *Cajamar ADN Agro*, 011, 1–11.
- Gregor, J., & Maršálek, B. (2004). Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll. *Water Research*, 38 (3), 517–522.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014a). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014b). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- López, P. (2016). *Diseño de un fotobiorreactor tubular para la producción de Chlorella vulgaris*. 81.
- Mayorga, C., Murillo, E., & Manso, L. (2017). Luteína y B-caroteno como principales antioxidantes acumulados en la microalga *Dunaliella salina*. *Revista Prisma Tecnológico*, 8(1), 34–38.
- Microalgas, P., & González-arechavala, Y. (2014). *Ana-Maria-Santos & Yolanda-Gonzales-Arechavala & Carlos-Martin-Sastre*.
- Nacional, U., Sur, D. E. L., Ana, L., & Martínez, M. (2008). *Lic. Ana María Martínez*.
- Parte, C. (1992a). *Cuarta Parte Biomasa Fototrofos : Clorofilas*. 1–6.
- Parte, C. (1992b). *Cuarta Parte Biomasa Fototrofos : Clorofilas*. 1–6.
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research*, 89(1), 27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- Romero, L., Guevara, M., D'armas, H., & Lodeiros, C. (2008). (). In *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela* (Vol. 47, Issue 1).
- Rubio Fernández, D., Alexandra Sierra Herrera, J., Ruiz Fonseca, S., & Andrés Sandoval Herrera, J. (n.d.). *Diseño de un fotobiorreactor Airlift a escala banco Grupo de investigación BIOTECFUA*.
- Ruiz, J. (2015). *Estudio de fotobiorreactor de microalga: Sistema de monitoreo y simulacion de estrategias de control*. 79.
- Santamaría, P. J. (n.d.). EI BETA-CAROTENO del ganado vacuno. *Control*.
- Sanz, V. (2019). *Diseño de un fotobiorreactor para la obtención de compuestos bioluminiscentes*. 95.
- Serpa Ibáñez, R. F., & Calderón Rodríguez, A. (2006). EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO EN EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES Y CLOROFILA DE CUATRO CEPAS PERUANAS DE *Dunaliella salina* Teod. *Ecología Aplicada*, 5(1–2), 93. <https://doi.org/10.21704/rea.v5i1-2.895>

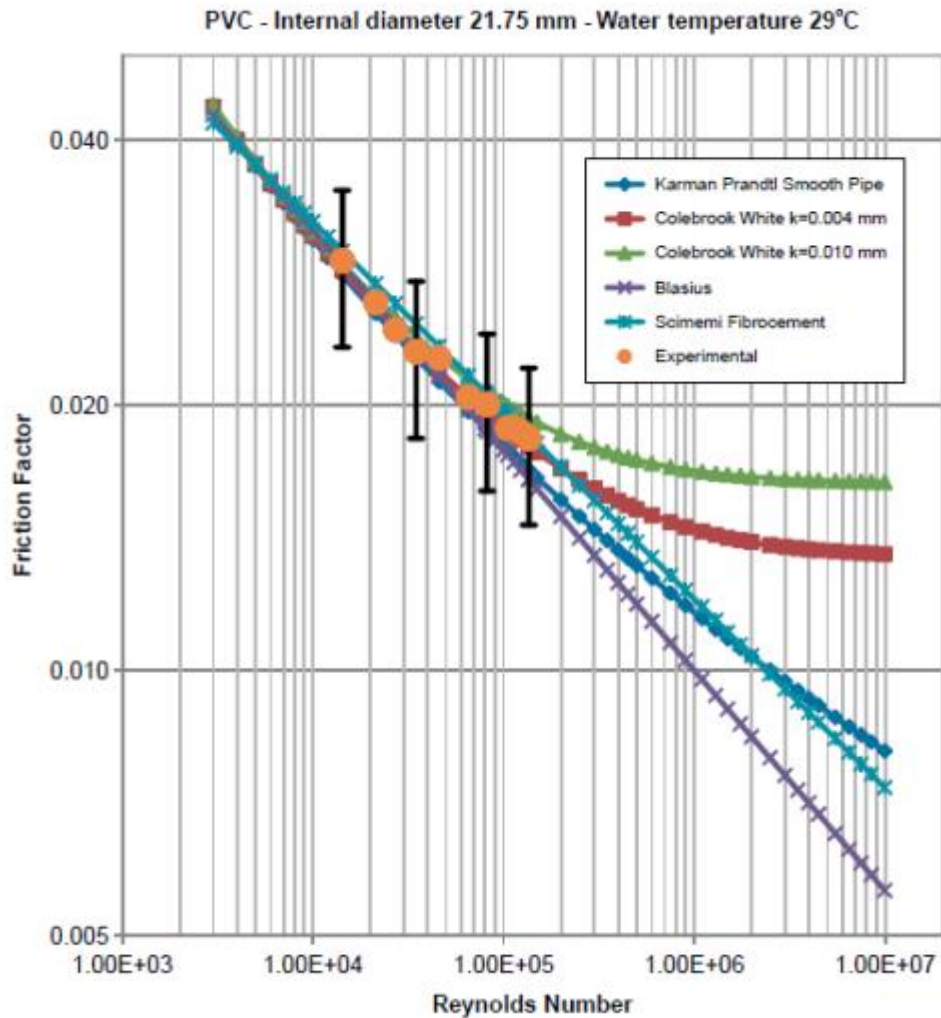
Yáñez, A. (2016). Capítulo9: Técnicas utilizadas en el análisis Experimental. In *Universidad de Sonora*.

ANEXOS

CAPITULO VII: ANEXOS

7. ANEXOS

A) DIAGRAMA DE MOODY



B) CODIGO DE ECUACION LOGISTICO MODIFICADA

```
from ipywidgets import interactive
import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np

def P(a, b, c, d, t):
    return np.log(a) + (np.log(b) - np.log(a)) / (1 + np.exp(4*c / (np.log(b) -
np.log(a)) * (d - t) + 2))
```

```

def f(a, b, c, d):
    N = 1000
    t = np.linspace(0, 1000, N)
    plt.figure(figsize=(11, 5))

    plt.subplot(1, 2, 1)
    plt.plot(t, P(a, b, c, d, t))
    plt.title("Población")
    plt.xlabel('Tiempo(h) ')
    plt.ylabel('X')
    plt.xlim(0, 500)
    plt.ylim(10, 15)

    plt.show()

interactive(f, a=(0, 74250), b=(0, 820625), c=(0.02888113,1), d=(-72,0))

```

C) DATOS DE PYTHON PARA MEDIO NATURAL 200ML

Dia	Horas	Conc(cel/ml)	Y=ln@	exponencial	Gomperz	Baranyi
0	1	18750	9,838949031	11,66610743	11,66610743	10,5075053
1	24	4,50E+05	13,01700286	12,23684913	12,23684913	11,18626218
5	120	3,31E+05	12,71062866	13,02481197	13,02481197	12,86750346
8	192	4,13E+05	12,92999148	13,08453297	13,08453297	13,0698243
12	288	4,56E+05	13,03079618	13,09341744	13,09341744	13,09300345
15	360	4,81E+05	13,08414216	13,09399932	13,09399932	13,09398632
19	456	4,31E+05	12,97444325	13,09408498	13,09408498	13,09408681
22	528	2,63E+05	12,47800636	13,09409058	13,31504759	13,09409058

D) DATOS DE PYTHON PARA MEDIO NATURAL 500ML

Dia	Horas	Conc(cel/ml)	Y=ln@	exponencial	Gomperz	Baranyi
0	1	1,88E+05	12,14153412	12,78066804	12,76088493	11,79315998
1	24	2,19E+05	12,2956848	12,79239456	12,78797142	12,15964118
5	120	1,75E+05	12,07254125	12,79333832	12,79333556	12,73952714
8	192	2,25E+05	12,32385568	12,79333834	12,79333556	12,78645144
12	288	2,69E+05	12,50153686	12,79333834	12,79333556	12,79290652
15	360	3,56E+05	12,78338801	12,79333834	12,79333556	12,79328435
19	456	3,19E+05	12,67216238	12,79333834	12,79333556	12,79333497
22	528	1,31E+05	11,78485918	12,79333834	12,79333556	12,79333792

E) DATOS DE PYTHON PARA MEDIO NATURAL 1000ML

Dia	Horas	Conc(cel/ml)	Y=ln@	exponencial	Gomperz	Baranyi
0	1	1,19E+05	11,68477572	12,6224086	12,58381977	11,69372905
1	24	1,94E+05	12,17432395	12,74449605	12,72373463	12,07623435
5	120	1,69E+05	12,03617361	12,75761834	12,75759091	12,69837087
8	192	2,19E+05	12,2956848	12,75761882	12,75761868	12,75001799
12	288	2,81E+05	12,54699923	12,75761882	12,75761882	12,75714207
15	360	3,44E+05	12,74766993	12,75761882	12,75761882	12,75755921
19	456	2,44E+05	12,40389839	12,75761882	12,75761882	12,75761509
22	528	2,25E+05	12,32385568	12,75761882	12,75761882	12,75761835

F) CODIGO DE ECUACION GOMPertz

```
from ipywidgets import interactive
import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np

def P(a, b, c, d, t):
    return np.log(b)+np.log((-1+np.exp(c*d)+np.exp(d*t))/(-
1+np.exp(d*t)+np.exp(d*t+np.log(b)-np.log(a))))
def f(a, b, c, d):
    N = 1000
    t = np.linspace(0, 1000, N)
    plt.figure(figsize=(11, 5))

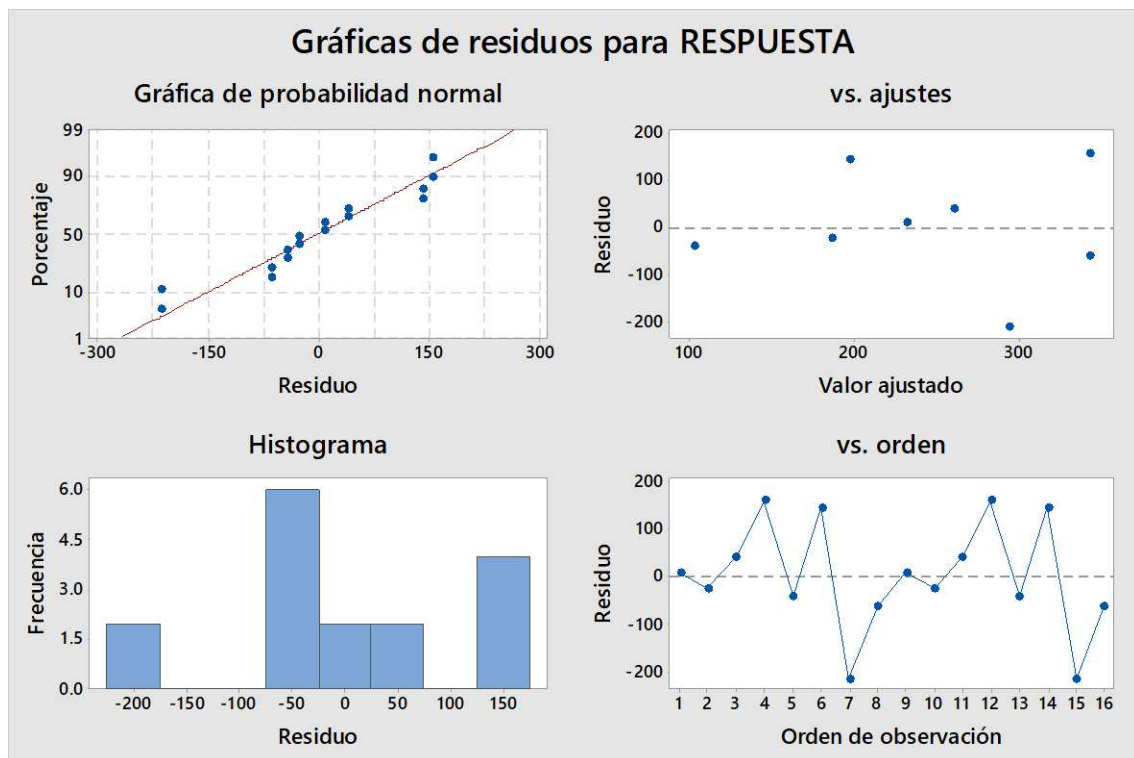
    plt.subplot(1, 2, 1)
    plt.plot(t, P(a, b, c, d, t))
    plt.title("Población")
    plt.xlabel('Tiempo(h)')
    plt.ylabel('X')
    plt.xlim(0, 1000)
    plt.ylim(0, 10)

    plt.show()
interactive(f, a=(0, 24750), b=(0, 435562), c=(0.02888113,1), d=(-72,0))
from ipywidgets import interactive
import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np
```

G) CODIGO DE ECUACION BARANYI-ROBERTZ

```
def P(a, b, c, d, t):  
    return np.log(a) + (np.log(b) - np.log(a)) * np.exp(-1 * np.exp(1 + c * 2.78 * ((d -  
t) / (np.log(b) - np.log(a)))))  
def f(a, b, c, d):  
    N = 1000  
    t = np.linspace(0, 1000, N)  
    plt.figure(figsize=(11, 5))  
  
    plt.subplot(1, 2, 1)  
    plt.plot(t, P(a, b, c, d, t))  
    plt.title("Población")  
    plt.xlabel('Tiempo(h)')  
    plt.ylabel('X')  
    plt.xlim(0, 500)  
    plt.ylim(10, 15)  
  
    plt.show()  
interactive(f, a=(0, 24750), b=(0, 435562), c=(0.02888113, 1), d=(-72, 0))
```

H) GRAFICAS DE RESIDUOS





MINISTERIO DE DESARROLLO PRODUCTIVO Y ECONOMÍA PLURAL



2024-TTE5-674-D-1

DIRECCIÓN DE DERECHO DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS
RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA NRO. 1-1676/2024
La Paz, 11 de junio de 2024

VISTOS:

La solicitud de Inscripción de Derecho de Autor presentada en fecha 04 de junio de 2024, por AXEL MAURICIO YUJRA ITURRALDE con C.I. N° 6017846 LP, con número de trámite DA 942/2024, señala la pretensión de inscripción del Proyecto de Grado titulado: "Comparación de métodos de extracción de Beta-carotenos de microalgas nativas de la Laguna Colorada en medio natural y en fotobioreactores", cuyos datos y antecedentes se encuentran adjuntos y expresados en el Formulario de Declaración Jurada.

CONSIDERANDO:

Que, en observación al Artículo 4º del Decreto Supremo N° 27938 modificado parcialmente por el Decreto Supremo N° 28152 el "Servicio Nacional de Propiedad Intelectual SENAPI, administra en forma desconcentrada e integral el régimen de la Propiedad Intelectual en todos sus componentes, mediante una estricta observancia de los regímenes legales de la Propiedad Intelectual, de la vigilancia de su cumplimiento y de una efectiva protección de los derechos de exclusividad referidos a la propiedad industrial, al derecho de autor y derechos conexos; constituyéndose en la oficina nacional competente respecto de los tratados internacionales y acuerdos regionales suscritos y adheridos por el país, así como de las normas y regímenes comunes que en materia de Propiedad Intelectual se han adoptado en el marco del proceso andino de integración".

Que, el Artículo 16º del Decreto Supremo N° 27938 establece "Como núcleo técnico y operativo del SENAPI funcionan las Direcciones Técnicas que son las encargadas de la evaluación y procesamiento de las solicitudes de derechos de propiedad intelectual, de conformidad a los distintos regímenes legales aplicables a cada área de gestión". En ese marco, la Dirección de Derecho de Autor y Derechos Conexos otorga registros con carácter declarativo sobre las obras del ingenio cualquiera que sea el género o forma de expresión, sin importar el mérito literario o artístico a través de la inscripción y la difusión, en cumplimiento a la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina, Ley de Derecho de Autor N° 1322, Decreto Reglamentario N° 23907 y demás normativa vigente sobre la materia.

Que, la solicitud presentada cumple con: el Artículo 6º de la Ley N° 1322 de Derecho de Autor, el Artículo 26º inciso a) del Decreto Supremo N° 23907 Reglamento de la Ley de Derecho de Autor, y con el Artículo 4º de la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina.

Que, de conformidad al Artículo 18º de la Ley N° 1322 de Derecho de Autor en concordancia con el Artículo 18º de la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina, referentes a la duración de los Derechos Patrimoniales, los mismos establecen que: "la duración de la protección concedida por la presente ley será para toda la vida del autor y por 50 años después de su muerte, a favor de sus herederos, legatarios y cesionarios"

Que, se deja establecido en conformidad al Artículo 4º de la Ley N° 1322 de Derecho de Autor, y Artículo 7º de la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina que: "...No son objeto de protección las ideas contenidas en las obras literarias, artísticas, o el contenido ideológico o técnico de las obras científicas ni su aprovechamiento industrial o comercial"

Que, el artículo 4, inciso e) de la ley N° 2341 de Procedimiento Administrativo, instituye que: "... en la relación de los particulares con la Administración Pública, se presume el principio de buena fe. La confianza, la cooperación y la lealtad en la actuación de los servidores públicos y de los



Oficina Central - La Paz
Av. Morales, N° 375,
entre Edo. Uruguay y
C. Batallón Illimani.
Telfs: 2162700
2162701 - 2162702

Oficina - Santa Cruz
Av. Uruguay, Calle
prolongación Quijano,
N° 29, Edif. Bicentenario.
Telfs: 3721752 - 72042936

Oficina - Cochabamba
Calle Bolívar, N° 133,
entre 16 de Julio y Antezana.
Telfs: 4141403 - 72042957

Oficina - El Alto
Av. Juan Pablo I, N° 2560
Edif. Multicentro El Ceibo
1da. Piso 2, Of. 53,
Zona 16 de Julio.
Telfs: 2141001 - 72043039

Oficina - Chuquisaca
Calle Kilómetros 7, N° 366
casi esq. Uribeaguirre,
Zona Parque Bolívar.
Telf: 72005873

Oficina - Tarija
Av. La Paz, entre
Calles Ciro Trigo y Alvarro
Edif. Santa Clara, N° 243.
Telf: 72075386

Oficina - Oruro
Calle 6 de Octubre, N° 5837,
entre Ayacucho
y Junín, Galería Central,
Of. 14.
Telf: 5201268

Oficina - Potosí
Av. Villazón entre calles
Wenceslao Albo y San Alberto,
Edif. AM. Salinas N° 242,
Primer Piso, Of. 17.
Telf: 72018161



ESTADO PLURINACIONAL DE BOLIVIA

MINISTERIO DE DESARROLLO PRODUCTIVO Y ECONOMÍA PLURAL

ciudadanos ...", por lo que se presume la buena fe de los administrados respecto a las solicitudes de registro y la declaración jurada respecto a la originalidad de la obra.

POR TANTO:

El Director de Derecho de Autor y Derechos Conexos sin ingresar en mayores consideraciones de orden legal, en ejercicio de las atribuciones conferidas.

RESUELVE:

INSCRIBIR en el Registro de Tesis, Proyectos de Grado, Monografías y Otras Similares de la Dirección de Derecho de Autor y Derechos Conexos, el Proyecto de Grado titulado: **"Comparación de métodos de extracción de Beta-carotenos de microalgas nativas de la Laguna Colorada en medio natural y en fotobiorreactores"** a favor del autor y titular: **AXEL MAURICIO YUJRA ITURRALDE** con C.I. N° **6017846 LP** bajo el seudónimo **AXEL**, quedando amparado su derecho conforme a Ley, salvando el mejor derecho que terceras personas pudieren demostrar.

Regístrese, Comuníquese y Archívese.

CASA/Im

Firmado Digitalmente por:

Servicio Nacional de Propiedad Intelectual - SENAPI
CARLOS ALBERTO SORUCO ARROYO
DIRECTOR DE DERECHO DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS
LA PAZ - BOLIVIA

Firma:



DHvQk8Qp4j63G

PARA LA VALIDACIÓN DEL PRESENTE DOCUMENTO INGRESAR A LA PÁGINA WEB: www.senapi.gob.bo/verificacion Y COLOCAR CÓDIGO DE VERIFICACIÓN O ESCANEAR CÓDIGO QR.



Oficina Central - La Paz
Av. Montes, N° 916,
entre Esq. Uruguay y
C. Batallón Illimani.
Telfs.: 2162000
2199206 - 2191821

Oficina - Santa Cruz
Av. Uruguay, Calle
Prolongación Quijano,
N° 29, Edif. Bicentenario.
Telfs.: 3121752 - 7204296

Oficina - Cochabamba
Calle Bolívar, N° 131,
entre 16 de Julio y Antezana.
Telfs.: 4141433 - 7204297

Oficina - El Alto
Av. Juan Pablo I, N° 2560
Edif. Multicentro El Ceibo
Uda. Piso 2, Of. 58,
Zona 16 de Julio.
Telfs.: 2149001 - 7204302

Oficina - Chuquisaca
Calle Villavieja 7, N° 346
cas. esp. Umbagoguá,
Zona Parque Bolívar.
Telf.: 7206612

Oficina - Tarija
Av. La Paz, entre
Calles Ciro Trigo y Avaroa
Edif. Santa Clara, N° 241.
Telf.: 7205286

Oficina - Oruro
Calle 6 de Octubre, N° 5617,
entre Ayacucho
y Aurín, Galería Central,
Of. 14.
Telf.: 67201286

Oficina - Potosí
Av. Villazón entre calles
Wenceslao Albá y San Alberto,
Edif. AM, Salinas N° 240,
Primer Piso, Of. 11.
Telf.: 72018160

www.senapi.gob.bo



Axel Mauricio Yujra Iturralde
Correo de contacto: axyuit@gmail.com
Cel: 73220159