



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA QUÍMICA

**“INFLUENCIA DE LA FASE ACUOSA DE
CARBONIZACIÓN HIDROTERMAL EN LA BIOFIJACIÓN DE
CO₂ EN MICROALGAS”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

QUÍMICA

AUTORES: MAYRA SILVANA ANDRADE GUERRERO

DAYSI NATALY BAYAS MOPOSITA

DIRECTORA: Dra. YOLANDA DOLORES DÍAZ HEREDIA MSc.

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, Mayra Silvana Andrade Guerrero & Daysi Nataly Bayas Moposita

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

Nosotras, ANDRADE GUERRERO MAYRA SILVANA y BAYAS MOPOSITA DAYSI NATALY, declaramos que el presente Trabajo de Integración Curricular es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autoras asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 29 de junio de 2022.



Mayra Silvana Andrade Guerrero
CI: 1751989763



Daysi Nataly Bayas Moposita
CI: 0250208394

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA QUÍMICA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación: “**INFLUENCIA DE LA FASE ACUOSA DE CARBONIZACIÓN HIDROTHERMAL EN LA BIOFIJACIÓN DE CO₂ EN MICROALGAS**”, realizado por las señoritas: **MAYRA SILVANA ANDRADE GUERRERO** y **DAYSI NATALY BAYAS MOPOSITA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su certificación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Carlos Alcívar Medina Serrano, Mgs. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-06-29
Dra. Yolanda Dolores Díaz Heredia, MsC. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2022-06-29
Dra. Mayra Jannet Espinoza Melendres, MsC. MIEMBRO DE TRIBUNAL		2022-06-29

DEDICATORIA

A mi padre Edgar Raúl Barrera Cordovilla, por amar, creer y proteger infinitamente a toda su familia. Por ser quien me enseñó que tras cada caída siempre hay un nuevo comienzo, con esfuerzo y sacrificio aquello que se persigue se vuelve real y satisfactorio. Es el ser de luz que guía mi camino, y del cual me aferro en su recuerdo.

Mayra

A mi padres y hermanos, por haberme acompañado a lo largo de toda mi formación académica tanto en lo económico como en lo emocional, enseñándome valores de respeto humano y fortaleza ante cualquier dificultad. A mis abuelitos, por ser motivo de unión y alegría familiar.

Nataly

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme estar en el momento y lugar adecuado; brindarme sabiduría, salud y paciencia para perseverar y alcanzar este instante gratificante de mi vida. A mis padres Raúl y Silvia; hermanos Luis, Pablo, Christopher y Anhai, las palabras no serán suficientes para expresar la admiración, el amor y el agradecimiento que les tengo por su apoyo incondicional. A mi familia, Guerrero Carvajal, por ser el sostén del que aprendo constantemente, son el lazo de cariño y confianza del que me siento orgullosa de pertenecer. A mis amigos y compañeros, Cristina, Carla, Camila, Carlos, Pablo, Henry y Nataly, porque las anécdotas, el compañerismo y la amistad es mutua. Son maravillosas personas y me alegra haber crecido académica y profesionalmente con ustedes.

A mi familia por inspirarme a ser alguien en la vida. A mi madre María, por ser un ejemplo de mujer valiente, trabajadora, amorosa y en especial, por ser mi amiga de vida. A mi padre Manuel, por su apoyo y cuidado incondicional. A mis hermanos Edison, Darwin y Wladimir, por su infinito cariño, apoyo y por compartir tantos momentos reconfortantes que marcaron mi vida. A mis amigos, en especial a Mayra, por su sincera amistad y compañerismo.

Al laboratorio de Biomasa del Instituto de Investigación Geológico y Energético (IIGE), por abrirnos las puertas en la realización de nuestras prácticas profesionales y el presente trabajo de integración curricular, en especial a Mgs. Paola Cuji, Quim. Carlos Méndez, Mgs. Cristhian Velalcázar por compartimos orientación, conocimientos y experiencias. A la facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por permitirnos adquirir conocimientos y desarrollar habilidades en múltiples áreas indispensables para el crecimiento personal y profesional. A nuestra tutora, asesora, y docentes; Dra. Yolanda Díaz, Dra. Mayra Zambrano, Dra. Magdy Echeverría, a los diferentes técnicos de laboratorio de la facultad y del IIGE por sus aportes y sugerencias para la correcta culminación del presente proyecto de investigación.

Mayra & Nataly

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ECUACIONES	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO O REFERENCIAL.....	8
1.1. Antecedentes.....	8
1.2. Bases Teóricas.....	9
1.2.1. <i>Importancia del cultivo microalgal</i>	9
1.2.1.1. <i>Cinética de crecimiento</i>	11
1.2.1.2. <i>Densidad óptica en el crecimiento microalgal</i>	13
1.2.1.3. <i>FT-IR en el reconocimiento de grupos funcionales</i>	13
1.2.1.4. <i>Sistemas de cultivo y rutas metabólicas</i>	14
1.2.1.5. <i>Factores y nutrientes de crecimiento</i>	15
1.2.1.6. <i>Preparación del cultivo</i>	16
1.2.2. <i>Uso de la Carbonización Hidrotermal</i>	16
1.2.2.1. <i>Obtención de la fase acuosa del pergamino de café</i>	17
1.2.3. <i>Biofijación de CO₂ en las microalgas</i>	18
1.2.3.1. <i>Determinación de la biofijación de CO₂</i>	19
1.3. Bases conceptuales.....	19
1.3.1. <i>Microalga Chlorella sp.</i>	19
1.3.2. <i>Cultivo mixotrófico</i>	19
1.3.3. <i>Activador</i>	20
1.3.4. <i>Dióxido de Carbono</i>	20
1.3.5. <i>Pergamino de café</i>	20
1.3.6. <i>Fase acuosa de la carbonización hidrotermal</i>	20
1.3.6.1. <i>Técnicas para la caracterización de la fase acuosa</i>	21

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	23
2.1.	Diseño de la Investigación	24
2.1.1.	<i>Diseño Experimental</i>	24
2.2.	Identificación de variables	25
2.3.	Localización del Estudio	25
2.4.	Población de estudio	26
2.5.	Tamaño de la muestra	26
2.6.	Método de muestreo	27
2.7.	Técnicas de recolección de datos	27
2.8.	Análisis estadístico inferencial	27
2.9.	Métodos	28
2.10.	Preparación de la fase acuosa de pergamino de café mediante HTC	28
2.10.1.	<i>Proceso de obtención de la fase acuosa</i>	28
2.11.	Etapa I de la evaluación de las condiciones óptimas	28
2.11.1.	<i>Curva de calibración estándar</i>	28
2.11.2.	<i>Preparación del cultivo</i>	29
2.11.3.	<i>Cuantificación de la concentración de biomasa microalgal por densidad óptica</i>	32
2.11.3.1.	<i>Tiempo de duplicación y tasa de crecimiento</i>	32
2.11.4.	<i>Cálculo de la productividad de biomasa microalgal</i>	33
2.11.5.	<i>Análisis estadístico etapa I</i>	33
2.12.	Etapa II de la biofijación del CO₂	33
2.12.1.	<i>Cálculo de la biofijación de CO₂ en Chlorella sp.</i>	34
2.12.2.	<i>Análisis elemental de Chlorella sp.</i>	34
2.12.3.	<i>Análisis estadístico Etapa II</i>	34
2.13.	Caracterización del pergamino de café	35
2.13.1.	<i>Análisis elemental del pergamino de café</i>	35
2.13.2.	<i>Análisis estructural (lignina, hemicelulosa y celulosa)</i>	35
2.13.3.	<i>Análisis proximal</i>	36
2.14.	Caracterización de la fase acuosa HTC	37
2.14.1.	<i>Conductividad y pH</i>	37
2.14.2.	<i>Demanda química de oxígeno</i>	37
2.14.3.	<i>Demanda biológica de oxígeno</i>	37
2.14.4.	<i>Cuantificación de ácidos orgánicos y carbohidratos</i>	38
2.14.5.	<i>Macroelementos</i>	39

2.14.5.1. <i>Nitrógeno Kjeldahl total (TNK)</i>	39
2.14.5.2. <i>Fósforo total (PT)</i>	39
2.14.6. <i>Micronutrientes (metales traza) y nutrientes secundarios</i>	41
2.15. <i>Análisis FT-IR de la biomasa microalgal</i>	41

CAPÍTULO III

3. MARCO DE DISCUSIÓN Y RESULTADOS	42
3.1. Resultados de la Etapa I o de la evaluación de las condiciones óptimas	42
3.1.1. <i>Curva de calibración del crecimiento microalgal</i>	42
3.1.2. <i>Cinética de crecimiento y cuantificación de la biomasa</i>	43
3.1.3. <i>Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación</i>	44
3.1.4. <i>Productividad de biomasa microalgal</i>	45
3.1.5. <i>Análisis estadístico</i>	46
3.2. Resultados de la caracterización del pergamino de café	52
3.3. Resultados de la caracterización de la fase acuosa HTC del pergamino de café .	53
3.4. Resultados del análisis FT-IR de la biomasa microalgal de la etapa I	56
3.5. Resultados de la Etapa II de la biofijación del CO₂	57
3.5.1. <i>Cinética de crecimiento microalgal y cuantificación de la biomasa</i>	57
3.5.2. <i>Parámetros cinéticos y composición elemental de <i>Chlorella sp.</i></i>	59
3.5.3. <i>Análisis estadístico de la biofijación de CO₂ en las microalgas</i>	62
3.5.4. <i>Resultados del análisis FT-IR de la biomasa microalgal de la etapa II</i>	63
CONCLUSIONES	64
RECOMENDACIONES	65
GLOSARIO	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Pico principal con la asignación de banda del grupo funcional.....	14
Tabla 2-1:	Ejemplo de las características de una fase acuosa del proceso de la carbonización hidrotermal.....	17
Tabla 3-2:	Diseño del MSR para el cultivo de microalgas <i>Chlorella sp.</i>	24
Tabla 4-2:	Diseño para el estudio de la biofijación de CO ₂ en <i>Chlorella sp.</i>	24
Tabla 5-2:	Materiales, reactivos y equipos para la obtención de la fase acuosa HTC.	28
Tabla 6-2:	Composición del fertilizante comercial.....	30
Tabla 7-2:	Materiales, reactivos y equipos para el cultivo de <i>Chlorella sp.</i>	31
Tabla 8-2:	Codificación y valores experimentales para el cultivo de <i>Chlorella sp.</i>	32
Tabla 9-2:	Puntos experimentales para la fase acuosa y activador.	33
Tabla 10-2:	Condiciones para el estudio de la biofijación de CO ₂ en <i>Chlorella sp.</i>	34
Tabla 11-2:	Reactivos de la solución nutritiva para DBO.	38
Tabla 12-2:	Materiales, equipos y reactivos para el análisis de ácidos orgánicos y carbohidratos.	38
Tabla 13-2:	Materiales, equipos y reactivos para el análisis de fósforo total.	39
Tabla 14-2:	Datos de la curva de calibración para el análisis del contenido de fósforo.	40
Tabla 15-2:	Metodología para el análisis de metales traza.	41
Tabla 16-3:	Datos para la relación lineal a OD _{680nm}	42
Tabla 17-3:	Resultados de la concentración de biomasa celular, ensayos RK1-RK9.....	43
Tabla 18-3:	Tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación microalgal.....	44
Tabla 19-3:	Productividad experimental.....	45
Tabla 20-3:	Base de datos ingresados al software estadístico.....	46
Tabla 21-3:	Análisis de varianza para la productividad.....	48
Tabla 22-3:	Análisis ANOVA para la productividad de biomasa microalgal.....	49
Tabla 23-3:	Optimización de la AP y activador para la productividad de biomasa microalgal.....	51
Tabla 24-3:	Caracterización del pergamino de café sin y con tratamiento de carbonización hidrotermal.	52
Tabla 25-3:	Caracterización de la fase acuosa del pergamino de café.....	53
Tabla 26-3:	Picos principales del análisis FT-IR de <i>Chlorella sp.</i>	56
Tabla 27-3:	Resultados de la concentración celular de los ensayos RL.....	58
Tabla 28-3:	Parámetros cinéticos y composición elemental de <i>Chlorella sp.</i>	59
Tabla 29-3:	Valores de la biofijación de CO ₂ en diferentes especies microalgales.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2: Localización de la presente investigación.....	26
Figura 2-2: Cepa de <i>Chlorella sp.</i> cultivada al 1,5% en bacto-agar y al 18 % de CO ₂	29
Figura 3-2: Fotobiorreactor con cultivo de <i>Chlorella sp.</i>	30

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1:	Descripción simplificada de las vías representativas en la biosíntesis de carbohidratos en microalgas.	11
Gráfico 2-1:	Fases de la cinética de crecimiento microalgal.	12
Gráfico 3-2:	Curva de calibración para el análisis del contenido de fósforo.	40
Gráfico 4-3:	Relación lineal a OD680 entre la concentración y la absorbancia.	42
Gráfico 5-3:	Cinética de crecimiento celular de <i>Chlorella sp.</i> de los ensayos RK.	44
Gráfico 6-3:	Tasa de crecimiento celular de <i>Chlorella sp.</i> para los ensayos RK.	44
Gráfico 7-3:	Gráfica de probabilidad normal de efectos.	47
Gráfico 8-3:	Gráfico de interacción para los factores experimentales.	48
Gráfico 9-3:	Diagrama de Pareto estandarizado.	50
Gráfico 10-3:	Superficie de respuesta estimada de la productividad microalgal.	50
Gráfico 11-3:	Espectros FT-IR de <i>Chlorella sp.</i> cultivada en los ensayos RK.	56
Gráfico 12-3:	Cinética de crecimiento para <i>Chlorella sp.</i> de los ensayos RL.	59
Gráfico 13-3:	Tasa de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> para los ensayos RL.	60
Gráfico 14-3:	Correlación de la biofijación de carbono en <i>Chlorella sp.</i>	62
Gráfico 15-3:	Espectros FT-IR de <i>Chlorella sp.</i> cultivadas en los ensayos RL.	63

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1-1: Fotosíntesis	10
Ecuación 2-1: Formación de ATP.....	10
Ecuación 3-1: Productividad de biomasa.....	12
Ecuación 4-1: Tiempo de duplicación o generación.....	13
Ecuación 5-1: Tasa de crecimiento específico	13
Ecuación 6-1: Biofijación de CO ₂	19
Ecuación 7-2: Expresión polinomial del Método de Superficie de Respuesta	25
Ecuación 8-2: Celulosa	35
Ecuación 9-2: Lignina.....	35
Ecuación 10-2: Sílice	35
Ecuación 11-2: Cenizas.....	36
Ecuación 12-3: Expresión polinomial para la productividad de biomasa <i>Chlorella sp.</i>	51

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** CONTROL DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR DE LOS CULTIVOS DE *Chlorella sp.*
- ANEXO B:** ANÁLISIS DE NITRÓGENO KJELDAHL TOTAL.
- ANEXO C:** DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y CARBOHIDRATOS POR HPLC.
- ANEXO D:** CUANTIFICACIÓN DE METALES TRAZA POR ABSORCIÓN ATÓMICA.
- ANEXO E:** DATOS DEL ANÁLISIS DE ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA PARA *Chlorella sp.* DE LOS ENSAYOS RK Y RL.
- ANEXO F:** PANORAMA DE *Chlorella sp.* EN EL MICROSCOPIO.
- ANEXO G:** OBTENCIÓN DE LA BIOMASA SECA MICROAGAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.
- ANEXO H:** PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES SERIALES CON *Chlorella sp.*
- ANEXO I:** FASE ACUOSA HTC DE PERGAMINO DE CAFÉ.
- ANEXO J:** PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL INÓCULO INICIAL.
- ANEXO K:** INSTALACIÓN DE CULTIVOS POR LOTES DE *Chlorella sp.*
- ANEXO L:** TOMA DE MUESTRA MICROALGAL DIARIA PARA LA LECTURA DE DENSIDAD ÓPTICA.
- ANEXO M:** CONTROL DE CINÉTICA CELULAR DE LOS CULTIVOS POR LOTES.
- ANEXO N:** USO DE LA CETRÍFUGA PARA LA COSECHA MICROALGAL.
- ANEXO O:** INSTALACIÓN DE LOS CULTIVOS DE *Chlorella sp.* PARA ESTUDIAR LA BIOFIJACIÓN DE CO₂.
- ANEXO P:** COSECHA DE LA MICROALGA *Chlorella sp.* DESPUÉS DE SU CENTRIFUGACIÓN.
- ANEXO Q:** MUESTRAS DEL PERGAMINO DE CAFÉ Y LA BIOMASA SECA DE *Chlorella sp.* PARA EL ANÁLISIS ELEMENTAL.
- ANEXO R:** AVAL DE LA INVESTIGACIÓN.
- ANEXO S:** CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE NORMATIVA.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AP	Fase acuosa del pergamino de café con tratamiento de carbonización hidrotermal
C	Carbono
Ca	Calcio
Cu	Cobre
CO₂	Dióxido de carbono
DBO	Demanda biológica de oxígeno
DCC	Diseño compuesto central
DQO	Demanda química de oxígeno
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
Fe	Hierro
H	Hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HTC	Carbonización hidrotermal
IIGE	Instituto de investigación geológico y energético
K	Potasio
Mg	Magnesio
MSR	Método de superficie de respuesta
N	Nitrógeno
Na	Sodio
NREL	National Renewable Energy Laboratory
NT	Nitrógeno total
NTK	Nitrógeno total Kjeldahl
O	Oxígeno
OD	Densidad óptica
PT	Fósforo total
RuBisCo	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa
S	Azufre
sp.	Especie no identificada de <i>Chlorella</i>
t_d	Tiempo de duplicación
μ	Tasa de crecimiento celular
UV-Vis	Espectroscopía ultravioleta visible
Zn	Zinc

RESUMEN

En este estudio se evaluó la influencia de la fase acuosa (AP) de la carbonización hidrotermal (HTC) y activador como nutrientes en la productividad y biofijación de CO₂ en las microalgas *Chlorella sp.* Para optimizar la adición de nutrientes, se empleó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). Los grupos funcionales de las microalgas cultivadas fueron analizadas por espectroscopia infrarroja y análisis elemental. Para la AP, el pH y conductividad fueron medidos con un multiparámetro, la demanda química de oxígeno (DQO) utilizando el método colorimétrico de dicromato de potasio, la demanda biológica de oxígeno (DBO) por el método respirométrico, el análisis de celobiosa, glucosa, xilosa, ácido láctico y acético por cromatografía líquida de alta eficiencia, el nitrógeno total por Kjeldhal (NTK), el fósforo total (PT) mediante el método colorimétrico y, metales traza por espectrofotometría de absorción atómica. El efecto en la biofijación se determinó utilizando entre 5-30% (v/v) de CO₂. Los niveles óptimos de nutrientes fueron 0,2 gL⁻¹ de activador y 1,317% de AP. La AP presentó un pH de 4,7, DQO de 4553,3 mg/LO₂, DBO de 1300 mg/LO₂, valores bajos de conductividad, PT, ácido láctico, xilosa y metales traza, sin detección de ácido acético, glucosa, celobiosa y NTK. La biofijación máxima de CO₂ fue de 71 mgL⁻¹d⁻¹ y la concentración más alta de biomasa de 0,402 gL⁻¹ que se determinaron al 15% de CO₂. Se identificó una mayor proporción de lípidos, carbohidratos y menor proporción de proteínas en la biomasa de *Chlorella sp.* volviéndolo provechoso para la obtención de biocombustibles. Finalmente, se concluyó que la AP aunque sostenible, no influyó significativamente en la productividad y biofijación de CO₂ en las microalgas, a excepción del activador. Se recomienda emplear diferentes puntos experimentales entorno al óptimo de nutrientes para diferenciar mejores resultados del efecto de la AP en la biofijación.

Palabras clave: <MICROALGAS (*Chlorella sp.*)>, <TRATAMIENTO DE CARBONIZACIÓN HIDROTERMAL>, <BIOFIJACIÓN>, <PERGAMINO DE CAFÉ>, <ACTIVADOR>, <FASE ACUOSA>, <CULTIVO MIXOTRÓFICO>.



1444-DBRA-UTP-2022

ABSTRACT

This study evaluated the influence of the aqueous phase (AP) of hydrothermal carbonization (HTC) and activator as nutrients on the productivity and biosequestration of CO₂ in *Chlorella sp.* microalgae. To optimize the addition of nutrients, the Response Surface Methodology (MSR) was used. The functional groups of the cultured microalgae were analyzed by infrared spectroscopy and elemental analysis. For AP, pH and conductivity were measured with a multiparameter, chemical oxygen demand (COD) using the colorimetric potassium dichromate method, biological oxygen demand (BOD) by the metric respite method, analysis of cellobiose, glucose, xylose, lactic acid and acetic acid by high efficiency liquid chromatography, total nitrogen by Kjeldhal (NTK), total phosphorus (PT) by the colorimetric method and, metals traced by atomic absorption spectrophotometry. The effect on biosequestration was determined between 5-30% (v/v) of CO₂. Optimal nutrient levels were 0,2 gL⁻¹ activator and 1,317% AP. The AP presented a pH of 4,7, COD of 4553,3 mg/LO₂, BOD of 1300 mg/LO₂, low conductivity values, PT, lactic acid, xylose, and trace metals, without detection of acetic acid, glucose, cellobiose and NTK. The maximum biosequestration was 71 mgL⁻¹d⁻¹ and the highest biomass concentration was 0,402 gL⁻¹ which were determined at 15% CO₂. A higher proportion of lipids, carbohydrates and lower proportion of proteins were identified in the biomass of *Chlorella sp.* making it profitable for gaining biofuels. Finally, it was concluded that the AP although sustainable, did not significantly influence the productivity and biosequestration of CO₂ in the microalgae, except for the activator. It is recommended to use different experimental points around the optimal nutrients to differentiate better results of the effect of AP on biosequestration.

Keywords: <MICROALGAE (*Chlorella sp.*)>, <HYDROTHERMAL CARBONIZATION TREATMENT>, <BIOSEQUESTRATION>, <COFFEE PARCHMENT>, <ACTIVATOR>, <AQUEOUS PHASE>, <MIXOTROPHIC CULTURE>.

EDISON
RENATO
RUIZ LOPEZ



Firmado
digitalmente por
EDISON RENATO
RUIZ LOPEZ
Fecha: 2022.07.12
14:41:43 -05'00'

INTRODUCCIÓN

Las emisiones de CO₂ se han acelerado drásticamente en los últimos 50 años y continúan aumentando en casi un 3% (Pires et al., 2012, pp. 3043-3053), lo que juega un papel importante en el calentamiento global al cambiar el balance de la radiación, la temperatura, la meteorología y la hidrología de la tierra (Feng et al., 2008, pp. 87-98). Tecnologías de eliminación y métodos biológicos resultan prometedores en la mitigación de este gas de efecto invernadero (Jin, Lim y Lee, 2006, pp. 2813-2824), en muchos de los cuales se han incluido a las microalgas como fuentes biológicas eficaces para la producción de energía renovable gracias a que presentan la capacidad de fijar el CO₂ entre 10-50 veces mejor que las plantas terrestres (Sosa, 2019, pp. 13-33). La presente investigación fue dividida en dos etapas para su mejor comprensión. Inicialmente, se buscó definir las condiciones óptimas de la fase acuosa y del activador para obtener la mejor productividad de biomasa microalgal *Chlorella sp.*, trabajándose con rangos de concentraciones entre (0,5-3,0 % v/v) y (0,2-0,6 g/L) respectivamente. En la segunda etapa, se buscó evaluar la biofijación microalgal de CO₂ al 5, 10, 15 y 30% v/v del mismo gas y en condiciones de nutrientes optimizados, 1,3 % v/v de AP y 0,2 g/L de activador. De esta forma, se empleó el agua residual de procesos hidrotermales y el activador como nutrientes alternativos necesarios para el desarrollo microalgal contribuyendo así a las tecnologías de mitigación y adaptación del cambio climático.

Planteamiento del problema

Enunciado del problema

En los últimos años, el problema del calentamiento global ha sido tema de estudio para muchos y sin embargo no se ha generado el impacto deseado, salvo en la comunidad científica, dejando al acumulo las causas y efectos de este. La Organización de las Naciones Unidas (ONU), en su informe reciente “Cambio Climático 2021: Bases físicas” aclara que el calentamiento global está avanzando rápidamente y expresó la urgencia de reducir las causas contribuyentes, en especial la persistencia del dióxido de carbono como gas de efecto invernadero producto de la energía y el calor que generan los combustibles fósiles en el transporte (46,7 %), las industrias (11,2 %), la agricultura, la deforestación e incluso el mismo hogar con un 18,9 % (IPCC, 2021, pp. 100-200; BEN, 2020, pp. 28-29) .

Además, en el Boletín de la Organización Meteorológica Mundial (OMM) sobre los “Gases de Efecto Invernadero” se expone que, no se han reducido las emisiones de CO₂ en los últimos años a excepción del período más intenso de confinamiento obligatorio a principios de 2020, en el que las emisiones diarias de CO₂ pueden haberse reducido hasta en un 17 % en relación con el 2019,

como producto de la caída drástica de la actividad industrial y cotidiana a nivel mundial debido a la pandemia (Barrie y Braathen, 2020, pp. 1-8).

Según la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL) en su publicación sobre las “Amenazas de cambio climático, métricas de mitigación y adaptación en ciudades de América Latina y el Caribe”, explica que 1,9 toneladas métricas de CO₂ han sido emitidas por cada residente en el Ecuador. Lo que constituye un 0,1 % de emisiones a nivel mundial. Siendo que, para el año 2020 las emisiones en el país alcanzaron 34,076 kTon CO₂ eq (BEN, 2020, pp. 28-29). Aunque es un país con emisiones por debajo del 0,5 % de CO₂ en el mundo, el gobierno trabaja por incorporar acciones de mitigación y adaptación del cambio climático, con el fin de optimizar la calidad de vida en relación con el bienestar ambiental y social (Siclari, 2021, pp. 43-61).

Frente a esta problemática varios estudios microalgales resultan prometedores en la sostenibilidad futura de la producción de biocombustibles, el balance de carbono, los impactos ambientales y los costos de producción (Yousuf, 2019, pp. 1-2). El cultivo de biomasa microalgal presenta importantes ventajas en relación a los cultivos tradicionales, entre ellas esta su gran capacidad de fijar CO₂ sea este proveniente de fuentes naturales como de fuentes antropogénicas (originadas por el hombre) e industriales; puede ser un recurso energético procesado como bioenergía, asimismo cultivado en diversos sistemas de masificación al considerar factores como la luz, el sustrato y los mecanismo de agitación (Cuji, 2020, pp. 3-4).

En base a (Clavijo Páez, 2021, pp. 2-6), Ecuador es rico en biodiversidad microalgal y existe a nivel mundial estudios previos que evidencian la capacidad que tiene esta especie para el desarrollo de tecnologías aplicables a la producción de biocombustibles. Con este proyecto de investigación, se pretende analizar la influencia de la fase acuosa de la carbonización hidrotermal del pergamino de café y de activador como nutrientes en la productividad y biofijación de CO₂ en las microalgas para así, contribuir a las tecnologías de mitigación ambiental con relación a este gas de efecto invernadero.

Formulación del problema

¿Influyen la fase acuosa de la carbonización hidrotermal del pergamino de café y el activador como nutrientes, en la productividad y biofijación de CO₂ en las microalgas *Chlorella sp.*?

JUSTIFICACIÓN

Dentro del contexto de la producción de biomasa algal, en el Ecuador, actualmente existen esfuerzos iniciales para su aprovechamiento en diferentes aplicaciones industriales (Ortiz et al., 2021, p.1-7). Estudios revelan que alrededor del 75 % del oxígeno que se respira es producido por

microalgas, de las cuales existen cerca de 40.000 especies. Estas se caracterizan por su capacidad de captura de CO₂ diez veces más rápida que una planta común (Yousuf, 2019, pp. 1-9).

Hoy en día, se considera que las microalgas presentan un futuro prometedor como fuente de bioenergía renovable debido a su rápida capacidad de crecimiento en medios acuáticos y en condiciones nutricionales óptimas, incluyendo primordialmente la energía solar. Las microalgas, además de ser consideradas como “energía verde” han sido importantes para contribuir en áreas como complementos alimenticios, lípidos, enzimas, biomasa, tratamiento terciario de aguas residuales, etc. Por su importante contenido de lípidos entre 5-58 % en *Chlorella sp.*, también son apreciadas como alternativa en la producción de biocombustibles de tercera generación que pretenden ser más respetuosos con el medio ambiente, menguando la emisión de gases de efecto invernadero (GEI), y permitiendo abaratar costos de producción respecto a los combustibles tradicionales. Si bien es cierto que ya existen biocombustibles a partir de materias primas vegetales, su costo ha representado entre un 70-85% de la producción total (Yousuf, 2019, pp. 1-9).

La relevancia en el impacto ambiental del consumo de CO₂ en el proceso, posibilita la disminución de las emisiones de este gas con el consiguiente efecto positivo sobre el calentamiento y el cambio climático. En 2019, la concentración de CO₂ ha sido drásticamente más alta que en los últimos siglos por ende su resultado principal ha conllevado al aumento de la temperatura de la superficie terrestre y el desequilibrio de los ecosistemas (IPCC, 2021, pp. 400-500). Aunque existen las llamadas tecnologías de Captura y Almacenamiento de Carbono (CAC), que se centran en la fijación fisicoquímica del CO₂ a partir de la adsorción, absorción, empleando membranas de separación de gases, entre otros, que buscan generalmente fijar, comprimir, y almacenar este gas en formaciones geológicas oceánicas e incluso ser eliminadas por procesos de mineralización; son consideradas como una solución a corto plazo debido a las posibles fugas y el peligro con la población circundante. Además, que dichas tecnologías requieren de gran energía en el proceso. Motivo por el cual, actualmente está creciendo el interés por estudiar la capacidad oceánica para captar el CO₂, pues resulta que el 40 % de este gas presente en la atmósfera es captado por los microorganismos fotosintéticos algales, llegando a constituir una tecnología biológica para la captura de carbono (Pires et al., 2012, pp. 1-11).

La tecnología de emplear microalgas en la biofijación de CO₂ no es reciente; sin embargo, no se ha indagado respecto al aprovechamiento de la fase acuosa de la carbonización hidrotermal (HTC) a partir de materias orgánicas como el pergamino de café. Por otro lado, los procesos termoquímicos como la licuefacción hidrotermal (HTL) y la carbonización hidrotermal (HTC) resultan ventajosas debido a que mejoran el rendimiento del proceso, al mismo tiempo que son respetuosas con el medio ambiente e innovadoras tecnológicamente (Lachos et al., 2022, pp. 1-2). Bajo este contexto, el HTC permite la alta producción de biomasa a bajo costo y su fase acuosa resulta ser sostenible por su reutilización, pues se puede tratar o recuperar los nutrientes y después

proceder a su descarga al ambiente o bien puede aplicarse a otras áreas como el riego en la agricultura cumpliendo así con una economía circular (Belete et al., 2019, pp. 1-8).

Gracias al interés por encontrar soluciones sostenibles frente a la persistencia de CO₂ en el ambiente como gas de efecto invernadero, con este proyecto de investigación se pretende analizar la influencia de la fase acuosa de la carbonización hidrotermal del pergamino de café y de activador como nutrientes en la productividad y biofijación de CO₂ en microalgas. Es así como, para alcanzar los objetivos descritos se cuenta con el aval del Laboratorio de Biomasa del Instituto de Investigación Geológico y Energético de donde serán proporcionados los recursos técnicos, reactivos, insumos, instrumentación y demás materiales necesarios para el desarrollo de este proyecto.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

Evaluar la influencia de la fase acuosa de la carbonización hidrotermal del pergamino de café y del activador como nutrientes en la productividad y la biofijación de CO₂ en las microalgas *Chlorella sp.*

Objetivos Específicos

- Definir las condiciones óptimas de concentración de fase acuosa HTC del pergamino de café y del activador de crecimiento para conocer la productividad de biomasa microalgal mediante el método de superficie de respuesta.
- Caracterizar física y químicamente la fase acuosa de la carbonización hidrotermal del pergamino de café a través del análisis del contenido de nitrógeno total, pH, conductividad, micro y macroelementos.
- Identificar los grupos funcionales (carbohidratos, lípidos, proteínas, entre otros) de los espectros FT-IR obtenidos de las microalgas secas de varias diluciones de fase acuosa y activador.
- Analizar la biofijación de CO₂ de las microalgas con las condiciones de nutriente optimizado en diferentes concentraciones del gas y posterior análisis elemental de la biomasa microalgal.

HPÓTESIS

Hipótesis nula (H₀)

La fase acuosa de la carbonización hidrotermal del pergamino de café y el activador como nutrientes no influyen en la productividad y biofijación de CO₂ en las microalgas *Chlorella sp.*

Hipótesis alternativa (H₁)

La fase acuosa de la carbonización hidrotermal del pergamino de café y el activador como nutrientes influyen en la productividad y biofijación de CO₂ en las microalgas *Chlorella sp.*

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO O REFERENCIAL

1.1. Antecedentes

Las emisiones de CO₂ se han acelerado drásticamente en los últimos 50 años y continúan aumentando en casi un 3% (Pires et al., 2012, pp. 3043-3053), lo que juega un papel importante en el calentamiento global al cambiar el balance de la radiación, la temperatura, la meteorología y la hidrología de la tierra (Feng et al., 2008, pp. 87-98). Por tal motivo, tecnologías de eliminación y métodos biológicos resultan prometedores en la mitigación de este gas de efecto invernadero (Jin, Lim y Lee, 2006, pp. 2813-2824), en muchos de los cuales se han incluido a las microalgas como fuentes biológicas eficaces para la producción de energía renovable gracias a que presentan la capacidad de fijar el CO₂ entre 10-50 veces mejor que las plantas terrestres (Sosa, 2019, pp. 13-33). Además, la biomasa algal proporciona un sistema de producción de energía más estable y manejable en comparación con otras fuentes de biomasa como los desechos agrícolas. Sin embargo, se han presentado algunas limitaciones en cuanto a su producción como el aislamiento de cepas, los altos costos de instalaciones, suministro de nutrientes, el óptimo funcionamiento de los sistemas de cultivo y el desarrollo de coproductos. Además, es importante recalcar que el abastecimiento regular de macro y micronutrientes para el crecimiento algal representan costos significativos en la industria (Tarhan et al., 2020, pp. 1-7).

Según (Tarhan et al., 2020, pp. 42-47), la carbonización hidrotermal (HTC) es un proceso de conversión termoquímico específico en el que se convierte la biomasa húmeda en un sólido con alto contenido total de carbono a partir de la descarboxilación y deshidratación de la biomasa en medio acuoso, a temperaturas elevadas y en condiciones de presión saturada. La fase acuosa y gaseosa de HTC esta enriquecida de nutrientes como C, N, P y compuestos tóxicos como derivados del fenol, siendo que en general, el 50-80 % de la materia prima inicial se encuentra en el hidrocarburo sólido (biochar), un 5-20% en la fase acuosa y de 2-5% en la fase gaseosa (Belete et al., 2019, pp. 1-8). El uso de las aguas residuales de procesos hidrotermales para la producción de microalgas resulta ser un enfoque prometedor (Leng et al., 2018, pp. 529-542). De hecho, (Belete et al., 2019, pp. 1-8) ha utilizado la fase acuosa obtenida del proceso HTC de lodos activados para el cultivo de *Chlorella sp.* y *Coelastrella sp.* concluyendo que no se presentó inhibición en su crecimiento. Por su parte (Du et al., 2012, pp. 354-357), investigó la viabilidad de utilizar nutrientes recuperados de la carbonización hidrotermal de *Nannochloropsis oculata* a la temperatura de 200 °C durante 40 min para cultivar *Chlorella vulgaris*. Otros estudios en los que se cultivaron *Phaeodactylum tricorutum*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Artrospira platensis* en fases acuosas (aguas

residuales) del proceso hidrotermal de la mismas biomasas, se afirmaron que no existió inhibición del crecimiento (Bagnoud-Velásquez et al., 2015, pp. 76-82) y (Hognon et al., 2015, pp. 23-31).

Por otro lado, con el fin de mejorar la productividad, en (Meng, Kassim y Cheirsilp, 2020, pp. 51-67) emplearon acetato de sodio y glicerol debido a que estos compuestos actuaron como una fuente de carbono exógeno. Los autores (Poddar, Sen y Martin, 2018, pp. 298-309) señalaron que, en condiciones de nitrato suficiente las productividades de *Nannochloropsis salina* y *Chlorella sp.* fueron 1,7 y 1,9 veces mayores en cultivo mixotrófico que en condiciones estrictamente fotoautótrofas. Siendo necesario para ambos casos la luz a fin de asimilar el glicerol. Mientras que, en condiciones de agotamiento de nitratos, ambas especies absorbieron solo cantidades mínimas del mismo, lo que evidencia la importancia de los efectos combinados del carbono y el nitrógeno. También, se ha determinado que la adición de eritorbato de sodio como antioxidante de bajo costo fue capaz de acelerar significativamente el crecimiento de las microalgas (Yen et al., 2013, pp. 166-174).

Finalmente, estudios recientes realizados en *Chlorella sp.* sugieren que estas especies son prometedoras candidatas para la asimilación de CO₂, reportándose que son capaces de lograr altas tasas de consumo entre 100 y 700 mgL⁻¹día⁻¹ (Adamczyk, Lasek y Skawińska, 2016, pp. 8-10). De hecho, estas especies junto a *Scenedesmus obliquus* han sido cultivadas en medios entre 30-50 % de CO₂ sin ningún problema, inclusive, *Cyanidium caldarium* o *Cyanidioschyzon merollae* se han desarrollado en concentraciones de hasta 100 % de CO₂ (Clement, 2012, pp. 60-61), esto ocurre porque los procesos celulares están interconectados al metabolismo fotosintético del carbono y permiten el crecimiento y rápida respuesta a las condiciones ambientales por parte de las microalgas (Wang, Stessman y Spalding, 2015, pp. 3-41).

1.2. Bases Teóricas

1.2.1. Importancia del cultivo microalgal

Las microalgas son microorganismos unicelulares fotosintéticos que generalmente crecen y se adaptan a cualquier medio acuático (Yousuf, 2019, pp. 1-9). Presentan una forma esférica de 2 a 10 μm de diámetro y se desarrollan en diferentes rangos de pH y salinidad. A más de los cloroplastos, se encuentran constituidas por auto esporas, pirenoides y una envoltura gelatinosa (pared celular). Se conocen mayormente por su capacidad de remover nutrientes del agua y fijar el CO₂ entre 10-50 veces mejor que las plantas terrestres (Sosa, 2019, pp. 13-33), gracias a que cuentan con mecanismos de concentración de carbono (MCC) (Meng, Kassim y Cheirsilp, 2020, pp. 51-67). A la vez, son precursoras de macromoléculas de alto valor comercial como lípidos, carbohidratos y proteínas que se pueden aprovechar para diferentes aplicaciones desde la bioenergía renovable, el tratamiento de aguas, hasta en la rama farmacéutica y nutricional de acuerdo con las

condiciones de cultivo. Asimismo, la reproducción de estos microorganismos puede darse de forma sexual, asexual o mixto y se conoce que en el mundo existen entre $(2 - 8) \times 10^5$ especies de microalgas, pero únicamente han sido estudiadas entre $(4 - 5) \times 10^4$ especies (Yousuf, 2019, pp. 1-9). Además, se ha determinado que para un cultivo mixotrófico, la productividad de biomasa microalgal es mayor (2,4-5,2 veces) respecto a cultivos autotróficos y heterotróficos debido a las condiciones combinadas (Poddar, Sen y Martin, 2018, pp. 298-309). Del mismo modo, utilizando una fase acuosa HTC optimizada, la productividad ha mostrado un 10 % de mejoría en comparación a un cultivo tradicional BG-11 (Belete et al., 2019, pp. 1-8; Sosa, 2019, pp. 13-33).

La función fotosintética que cumple una microalga se explica con la reacción del dióxido de carbono y el agua para formar oxígeno y azúcar (hexosa). Misma que, se indica a continuación:



El CO_2 (véase ecuación 1-1) es la fuente de carbono inorgánico que se utiliza en sustitución de energía para la fotosíntesis y el agua actúa como reductor que aporta el hidrógeno necesario para la biosíntesis de carbohidratos, adquiriéndose además oxígeno como subproducto (Sosa, 2019, pp. 13-33). Sin embargo, las microalgas también pueden obtener carbono de compuestos orgánicos (glucosa, glicerol, acetato, lactato, etc.) para su crecimiento. La fuente de carbono debe ser económicamente barata para que resulte viable. Sin embargo, la limitante de los cultivos de microalgas son los costes de producción y el consumo de agua. Con el cultivo mixotrófico, se logra reducir dichos costes, aumentar la velocidad de crecimiento celular y generar una mayor productividad de biomasa microalgal que puede ser recuperado mediante su cosecha (León et al., 2019, pp. 31-38).

El carbono orgánico alimentado al cultivo es utilizado para la formación de biomasa de las microalgas (en especial lípidos) que, en primer lugar, en un cultivo mixotrófico las reacciones de luz impulsada por sistemas de transporte de electrones se destinan a la formación de ATP (véase ecuación 2). Donde, NADP, Pi y APF son fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina, fosfato inorgánico y flujo de fotones de luz absorbida, respectivamente. NADPH y ATP reducen el CO_2 por una serie de reacciones oscuras llamadas ciclo de Calvin que ocurren en los cloroplastos (véase gráfico 1-1) para luego dirigirse al citoplasma y continuar con el ciclo de Krebs (Tarhan et al., 2021, pp. 1-9).

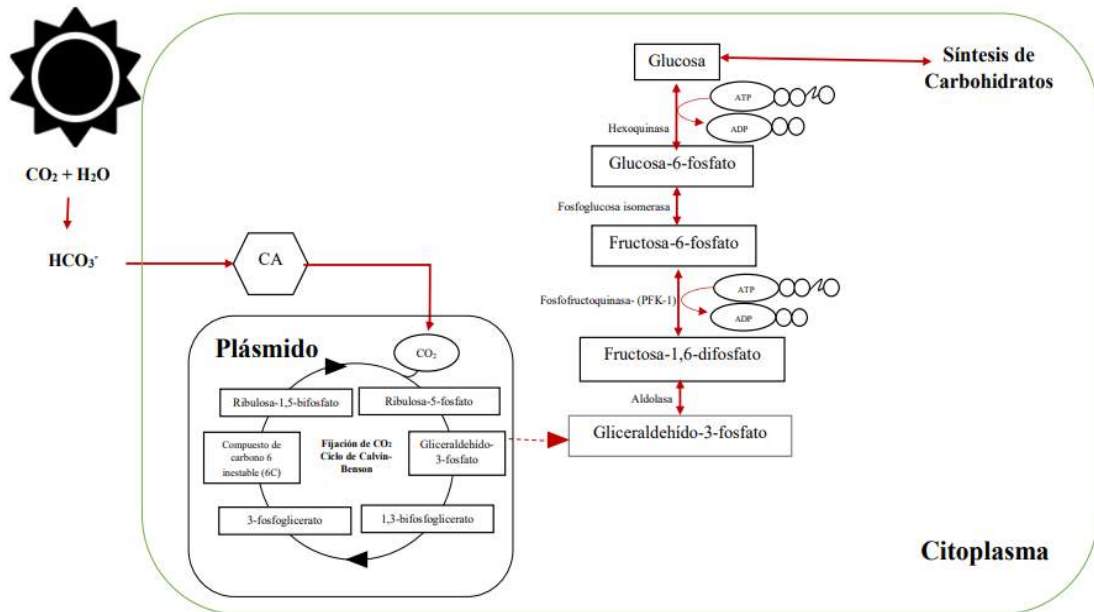


Gráfico 1-1: Descripción simplificada de las vías representativas en la biosíntesis de carbohidratos en microalgas.

Fuente: (Meng, Kassim y Cheirsilp, 2020, pp. 51-67).

En las microalgas, los carbohidratos pueden emplearse como componentes estructurales en las paredes celulares compuestas por celulosa pura que resultan indispensables en términos de protección, soporte y estructura; también como compuestos de almacenamiento en la célula de donde se suministra la energía necesaria para los procesos metabólicos de los organismos y que, junto con el almidón en el citoplasma son fácilmente fermentables por acción bacteriana para producir bioetanol, la misma que, es una aplicación de “energía verde” investigada recientemente (Van y Laurens, 2020, pp. 191-202). Es importante recalcar, que su composición varía en dependencia de las cepas de microalgas, así como de las condiciones nutricionales y ambientales (Meng, Kassim y Cheirsilp, 2020, pp. 51-67).

1.2.1.1. Cinética de crecimiento

La replicación y velocidad de crecimiento celular de las microalgas se da de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes en su medio. Es así como, el gráfico 2-1 indica las fases del crecimiento celular en función del tiempo:

1. Fase de latencia: Período de crecimiento y adaptación temprana al medio de cultivo que depende del tamaño del inóculo.
2. Fase exponencial: Período de división celular rápida y exponencial que ocurre cuando hay una cantidad apreciable de células.

3. Fase de degeneración relativa al crecimiento: Esta fase ocurre cuando es limitante un requisito de crecimiento (nutriente, factor ambiental, etc.) necesarios para la división celular.
4. Fase estacionaria: La división celular se ralentiza manteniéndose constante por la falta de recursos necesarios para el crecimiento, y puede durar semanas o meses.
5. Fase de muerte o lisis celular: Las células comienzan a morir por la deficiencia de nutrientes. (Yousuf, 2019, pp. 1-9).

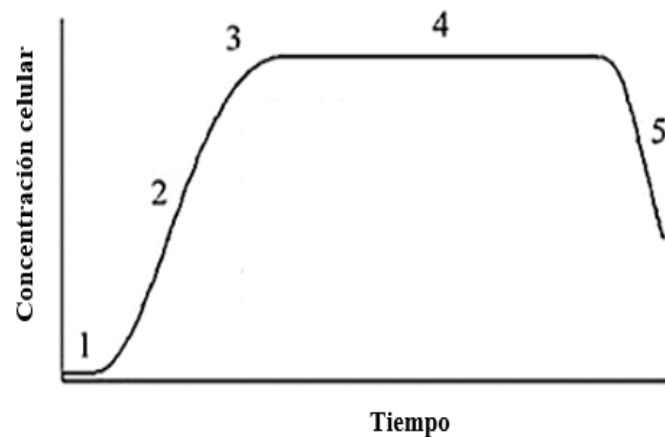


Gráfico 2-1: Fases de la cinética de crecimiento microalgal.

Fuente: (Yousuf, 2019, pp. 1-9).

Las microalgas aumentan su biomasa cada 24 horas, aunque en la fase de crecimiento exponencial pueden hacerlo cada 3,5 horas, de hecho, con *Chlorella sp.* dicha fase ha transcurrido generalmente al octavo día de cultivo, punto en el que se determina la productividad, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación. Posteriormente, continúa la fase de degeneración relativa y la fase estacionaria de crecimiento celular (Yatirajula et al., 2019, pp. 1-7).

Por otro lado, para conocer la productividad de biomasa de las microalgas, es decir, la máxima concentración celular que se alcanza respecto al primer día de cultivo se aplica la fórmula siguiente:

$$P_b \left(\frac{g}{L \text{ día}} \right) = \frac{(X_2 - X_1)}{(t_2 - t_1)} \quad [3-1]$$

Donde, P_b es la productividad de biomasa, X_2 es la concentración de biomasa (gL^{-1}) en el tiempo t_2 (d), y X_1 es la concentración de biomasa (gL^{-1}) en el momento t_1 (d) de acuerdo con la literatura (Du et al., 2012, pp. 354-357).

1.2.1.2. Densidad óptica en el crecimiento microalgal

En el contexto de las microalgas, la densidad óptica media se determina a 680 nm con ayuda de un espectrofotómetro UV-visible. Para ello, se hace brillar un haz de luz a través de una suspensión de material particulado, en este caso un analito de cultivo celular; la disminución en la cantidad de luz transmitida en relación con un blanco que contiene el líquido en suspensión y sin partículas, es lo que comúnmente se denomina absorbancia. El valor de esta longitud de onda se puede relacionar con la concentración celular empleando una curva estándar adecuada (Griffiths et al., 2011, pp. 119-123).

Una vez determinado el valor de la concentración celular, según (Wang et al., 2010, pp. 1-13), a partir de las ecuaciones 4-1 y 5-1 es posible estimar el tiempo de duplicación (t_d día) o el tiempo que tardan las células vivas en duplicarse y la tasa de crecimiento (μ día⁻¹) respectivamente:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [4-1]$$

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad [5-1]$$

Donde X_2 y X_1 corresponden a la concentración celular de biomasa en cualquier momento t_2 (día) y el anterior t_1 (día) del tiempo de cultivo de microalgas, y μ (día⁻¹) es la tasa de crecimiento del cultivo de algas (Wang et al., 2010, pp. 1-13).

1.2.1.3. FIT-IR en el reconocimiento de grupos funcionales.

Se ha establecido a la espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR) como una herramienta para identificar grupos funcionales vibratoriamente activos en muestras biológicas, organismos completos y articulados (bacterias, hongos, levaduras), organismos unicelulares y pluricelulares como algas y plantas superiores de manera confiable, rápida y fácil en condiciones de laboratorio (Duygu et al., 2012, pp. 1-8).

De manera general, es utilizada para medir la absorbancia entre 4000-400 cm⁻¹. Siendo así que, (Yatirajula et al., 2019, pp. 1-7) recalca la presencia de aminos, lípidos, celulosa, alquinos, polisacáridos y ácidos nucleicos en microalgas (véase tabla 1-1).

Tabla 1-1: Pico principal con la asignación de banda del grupo funcional.

Pico principal (cm⁻¹)	Banda típica y asignación de la literatura	Rango de número de onda (cm⁻¹)
3340	O-H estiramiento, agua	3029-3639
2240	C-N estiramiento	2250-2220
2121	C-C estiramiento, alcanos	2100-2260
1633	v C=O estiramiento, celulosa	1583-1709
1417	-CH ₂ estiramiento, lípidos	1357-1423
1317	>P=O estiramiento, ácidos nucleicos	1191-1356
1060	C-O-C carbohidratos de polisacáridos	980- 1072

Fuente: (Yatirajula et al., 2019, pp. 1-7).

Realizado por: Andrade, M; Bayas, D, 2022.

1.2.1.4. Sistemas de cultivo y rutas metabólicas

Formas de cultivo microalgal:

- Cultivos autotróficos: Se requiere esencialmente luz como fuente de energía para llevar a cabo la fotosíntesis.
- Cultivos heterotróficos: Se requiere materia rica en carbono orgánico (glucosa o acetato) y no de luz como fuente de energía.
- Cultivos mixotróficos: Es una combinación de los cultivos autotrófico y heterotrófico por lo que tienen la capacidad de ingerir materia con carbono inorgánico (CO₂) y orgánico como glucosa, piel de frutas, fructosa, acetato, glicerol, etc. (Zuccaro et al., 2019, pp. 11-29). Es característico por presentar una mayor tasa de crecimiento, productividad de biomasa (lípidos, carbohidratos), proceso fácil de extender y controlar, finalmente, posee una fase de crecimiento exponencial más prolongada (Meng, Kassim y Cheirsilp, 2020, pp. 51-67).

Sistemas de cultivo microalgal:

- Sistemas de cultivo abierto: Se realiza a cielo abierto aprovechando la luz solar en estanques de hormigón que permitan mantener una fuerza hidrodinámica óptima y canales de circuito cerrado para homogenizar las células. Sin embargo, a pesar de que el consumo de agua es alto al igual que el riesgo de contaminación, el 80 % de microalgas en el mundo son cultivadas de esta manera debido a su menor inversión de implementación (God, 2020, pp. 25-26; Yousuf, 2019, pp. 2-5).
- Sistemas de cultivo cerrado: Presentan menor riesgo de contaminación y se realizan en equipos denominados fotobiorreactores o PBR, por lo que, dependen de los parámetros que requiera el cultivo como luz, circulación, temperatura, etc. Existen fotobiorreactores de columna o burbuja, tubulares, de placa plana, entre otros (Yousuf, 2019, pp. 2-5).

1.2.1.5. Factores y nutrientes de crecimiento

De acuerdo con (Yousuf, 2019, pp. 1-9), las condiciones principales que necesitan las microalgas para crecer en un medio de cultivo dependen de tres factores:

A. Factores ambientales

- **pH:** El pH permite medir que tan alcalino o ácido se encuentra el medio donde se cultiva las microalgas. En las microalgas el valor pH óptimo se encuentra entre 6-8 y guarda relación con la solubilidad de minerales y del CO₂ suministrado pues, si este gas se encuentra en exceso, el pH se sitúa bajo 7 lo que puede lastimar la fisiología de las microalgas, sin embargo, se mejora la captación de CO₂ que termina convirtiéndose en biomasa; en cambio, si el CO₂ es escaso, induce a que el pH este por encima de 10, lo que inhibiría la fotosíntesis (Yousuf, 2019, pp. 1-9).
- **Nutrientes:** Las microalgas están compuestas principalmente de C (40-50 %), N (4-8 %) y fosfatos (0,1 %) en peso seco, por lo que requieren esencialmente de estos nutrientes y microelementos como Fe, Mg, Mn, B, Mo, K, Co, Zn (Yousuf, 2019, pp. 1-9). Sin embargo, la proporción de los nutrientes va a depender de acuerdo con los propósitos aplicativos que tenga el cultivo microalgal. Por ejemplo, si se aplica una limitación de nitrógeno y concentración óptima de acetato de sodio, se estimulará a las microalgas a que cambien la ruta metabólica destinada a producir proteínas por las rutas de síntesis para una mayor producción de lípidos y carbohidratos. Tanto el carbono orgánico (glucosa, xilosa, rammnosa, fructosa, sacarosa y galactosa) e inorgánico (CO₂), en condiciones mixotróficas, contribuyen al aumento de la productividad de biomasa microalgal, en especial de carbohidratos, que se explica por el exceso de adenosín trifosfato (ATP) generada en la fase oscura del metabolismo (Meng, Kassim y Cheirsilp, 2020, pp. 51-67). Durante el cultivo, no debe haber presencia de metales tóxicos como el plomo, litio, níquel, cromo porque modificarían la morfología y estructura celular (Belete et al., 2019, pp. 1-8).
- **Temperatura:** La mayoría de las microalgas crecen entre 15-40 °C, sin embargo, hay una preferencia entre 25 y 30 °C, en especial si se quiere cultivar estos microorganismos para extraer lípidos (Yousuf, 2019, pp. 1-9).

B. Factores bióticos

En ocasiones, en el cultivo de las microalgas puede haber la presencia de microorganismos no deseados como hongos (*Chytridium sp.*, *Aphelidium sp.*, etc.) que provocan la floculación del cultivo, bacterias (*Aeromonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, etc.), u otras especies de microalgas como el rotífero (*Brachionus*) que contaminan el medio de crecimiento o bien, pueden reducir la cantidad de nutrientes de este. Por ende es importante la elección del modo de cultivo (sistema abierto o cerrado) y de la especie a cultivar (Yousuf, 2019, pp. 1-9; Abalde et al., 1995, pp. 59-60).

C. Parámetros de cultivo

Los parámetros de cultivo se aplican para optimizar y homogenizar el medio de crecimiento microalgal. Entre los principales parámetros están:

- **Mezcla:** Se lo realiza para evitar sedimentación del cultivo y permitir que la luz sea captada en igual cuantía para todas las células. Por ello, se utiliza el equipo adecuado, por ejemplo, un fotobiorreactor o PBR con un agitador mecánico y burbujeo con CO₂ o aire evitando la rigurosidad (Yousuf, 2019, pp. 1-9).
- **Intensidad de luz:** En microalgas cultivadas bajo dependencia de luz, su valor preferencial es 1000 lux en matraces de 5000-10000 mL con intercalación de luz-oscuridad; la primera favorece a la fotosíntesis y generación de ATP y NADPH en el metabolismo microalgal, mientras que, la segunda permite la síntesis de biomoléculas (Yousuf, 2019, pp. 1-9).

1.2.1.6. Preparación del cultivo

El cultivo de microalgas se realiza a partir de la cepa aislada y crecida en un medio BG-11 a temperatura ambiente y luz blanca por 15 días aproximadamente. Después, se preparan los cultivos a partir del inóculo madre por diluciones seriales; se adiciona el medio de cultivo suplementada con fertilizantes NPK y la fase acuosa HTC en un Erlenmeyer de 250 mL, por triplicado, acompañado de luz blanca a 25 °C por alrededor de 6 días como mínimo y con control de cinética celular diario. Al final, las microalgas son recogidas por centrifugación y secadas a 60 °C para análisis posteriores (Belete et al., 2019, pp. 1-8).

1.2.2. Uso de la Carbonización Hidrotermal

Proceso de conversión termoquímico específico en el que se convierte la biomasa húmeda en un sólido con alto contenido total de carbono a partir de la descarboxilación y deshidratación de la biomasa en medio acuoso, a temperaturas elevadas y en condiciones de presión saturada (Tarhan et al., 2021, pp. 1-9). Esencialmente, es un proceso formado por agua, materia inorgánica (CO₂) y orgánica (materia prima), que permite tratar cualquier compuesto orgánico húmedo en un sólido hidrocarburífero de alto valor calórico a temperaturas entre 180-250 °C y una presión autógena por el agua en estado subcrítico que esta entre 10-20 bar o 1-5MPa. La fase acuosa y gaseosa de HTC esta enriquecida de nutrientes como C, N, P, y compuestos tóxicos como derivados del fenol, siendo que en general, el 50-80 % de la materia prima inicial se encuentra en el hidrocarburo sólido (biochar), un 5-20% en la fase acuosa y de 2-5% en la fase gaseosa (Belete et al., 2019, pp. 1-8). A escala de laboratorio el proceso de la carbonización hidrotermal se realiza en biorreactores discontinuos o batch, los cuales, operan a una temperatura constante con comportamiento ideal de la reacción sólido-líquido con una mezcla perfecta. Este equipo permite obtener grandes

cantidades de cultivo a pesar de su limitación de producción, sin embargo, se estima que su uso vaya aumentando en los próximos años (Tarhan et al., 2021, pp. 1-9). El reactor HTC está elaborado de acero inoxidable, el tiempo de operación general es de 1 h y se puede utilizar materias ricas en biomasa lignocelulósicas. A diferencia de otros métodos hidrotermales como la licuefacción y gasificación, el HTC utiliza condiciones suaves de ejecución, además, no necesita de un catalizador. El producto sólido resultante del HTC es utilizado como combustible sólido, absorbente para purificación de aguas, enmendar el suelo o retener carbono. Sin embargo, los altos costos ambientales y financieros son los desafíos principales para el cultivo de microalgas industriales, debido a la significativa necesidad de agua, CO₂ y nutrientes que dificultan la comercialización de microalgas (Belete et al., 2019, pp. 1-8; Mendoza et al., 2021, pp. 2-18). Para contrarrestar los costes del uso del agua, se ha estudiado la utilización de efluentes tanto de aguas residuales industriales como aguas de proceso HTC provenientes de residuos orgánicos (Castro et al., 2021, pp. 1-13).

1.2.2.1. Obtención de la fase acuosa del pergamino de café

En (Belete et al., 2019, pp. 1-8) se indica que para un biorreactor de acero inoxidable de 50 mL, la relación biomasa-agua empleada fue de 1:3, a temperaturas de 180°C durante 240 minutos, de inmediato se coloca en baño con hielo; y se procede a retirar los productos sólidos por filtración al vacío. El sólido carbonizado se seca a 105 °C por 24 h, mientras que, la fase acuosa se almacena a -20 °C hasta el momento de su uso. En la tabla 2-1 se muestran algunos parámetros y nutrientes encontrados en la fase acuosa reciclada de lodos activados proveniente de la carbonización hidrotermal destinada para el cultivo de microalgas. Finalmente, es recomendable una relación TN-TP de 5:1–28:1 respectivamente y una alta conductividad (Belete et al., 2019, pp. 1-8).

Tabla 2-1: Ejemplo de las características de una fase acuosa del proceso de la carbonización hidrotermal

Parámetro	Concentración (mg/L)	Metales	Concentración (mg/L)
COD	134800±2287	K	775,45
TOC	45700±1513	Mg	4,025
TN	9650±1582	Mn	0,01
Amonio	1343±75	Fe	3,085
Nitrato	211±20	Na	8966
Nitrito	3,63±0,73	B	1,855
TP	343±43	Ni	0,005

Fuente: (Du et al., 2012, pp. 354-357).

Realizado por: Andrade, M; Bayas, D, 2022.

1.2.3. Biofijación de CO₂ en las microalgas

El CO₂ es uno de los principales gases de efecto invernadero generado por actividades antropogénicas del ser humano en más del 46 % (transporte, industrias, etc.). Se estima que para 2050 la concentración de CO₂ aumente en un 70 % respecto al 2010 (30,6 Gt) a nivel global (Adamczyk, Lasek y Skawińska, 2016, p. 2). En Ecuador, en 2016 se produjeron 35,02 Mton y se estima que para 2030 se alcance 46,54 Mton de CO₂ (Arroyo y Miguel, 2019, pp. 2-15).

La idea de la captura de carbono por microalgas aún está en estudio, sin embargo, *Chlorella sp.* se ha utilizado por su capacidad de adaptarse a grandes niveles de concentraciones de CO₂ (5-15%) respecto a otras especies microalgales (Meng y Kassim, 2017, pp. 1-2). El mecanismo de adaptación o resistencia al CO₂ se conoce que inicia cuando las microalgas en su mayoría absorben el CO₂ por difusión pasiva a través de la membrana celular (que contiene a los estromas de los cloroplastos) en medios con concentraciones no muy altas de CO₂ (<30%), sin embargo, especies como *Chlorella sp.* y *Scenedesmus obliquus* han sido cultivadas en medios entre 30-50 % CO₂ sin ningún problema, inclusive, otras especies como *Cyanidium caldarium* o *Cyanidioschyzon merollae* han sido desarrolladas en concentraciones de hasta 100 % CO₂ (Clement, 2012, pp. 60-61).

En el mismo contexto, la adaptabilidad al CO₂ en las microalgas puede deberse a la activación e inactivación de genes inducibles por CO₂, que son proteínas transportadoras de C (influye la afinidad) presentes en los cloroplastos de la pared celular, así como otros complejos enzimáticos (por ejemplo, el fotosistema II y I) que permiten la interconversión del CO₂ a HCO₃⁻ (y viceversa) disueltos en el medio para ser asimilados y llevar a cabo las reacciones fotosintéticas. Todo esto, en dependencia de cada especie; para *Chlamydomonas* a una muy baja concentración de CO₂ (<0,02 %), las proteínas captadoras de C inorgánico son funcionales, pero no a concentraciones bajas de CO₂ (0,03-0,4 %). La concentración de CO₂ en el aire esta entre 0,03-0,05 % y se cataloga como bajo. En resumen, todas las rutas metabólicas como: asimilación de nutrientes, síntesis de lípidos, carbohidratos y proteínas, junto a los demás procesos celulares están interconectados al metabolismo fotosintético del carbono y permitiendo una rápida respuesta a las condiciones ambientales en las que se encuentra la microalga (Wang, Stessman y Spalding, 2015, pp. 3-41).

El ciclo de Calvin-Benson es la ruta principal para el metabolismo del carbono (véase gráfico 1-1), por ende, la rubisco (Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) es la enzima que actúa en la primera reacción de carboxilación con el fin de incorporar el carbono inorgánico al carbono orgánico del ciclo. La rubisco se caracteriza por cumplir doble función: la carboxilasa (mayor afinidad catalítica al CO₂) y la oxigenasa (mayor afinidad catalítica al O₂). Por lo que, preferentemente se busca saturar el sitio activo de esta enzima con CO₂ y de esa forma omitir su

función oxigenasa, la cual gasta energía y elimina el CO₂ que se ha fijado, a través de la fotorrespiración celular (Clement, 2012, pp. 50-60).

1.2.3.1. Determinación de la biofijación de CO₂

De acuerdo con (Fan et al., 2015, pp. 1-12), la biofijación de CO₂ a partir de la productividad de biomasa seca se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$\text{Biofijación de CO}_2 = P \times C \times \frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C} \quad [6-1]$$

En donde, P representa la productividad de biomasa (g/Ldía), C el carbono contenido en la biomasa, MCO₂ corresponde al peso molecular del CO₂ (g) y MC al peso molecular de C (g).

1.3. Bases conceptuales

1.3.1. Microalga Chlorella sp.

Las microalgas son organismos fotosintéticos microscópicos simples que utilizan la energía solar, CO₂ y nutrientes para producir ATP, y no necesitan arraigar o generar estructuras reproductoras, permitiéndoles duplicarse en cuestión de horas (Yousuf, 2019, pp. 1-9).

La especie *Chlorella sp.* es un alga verde unicelular de forma elipsoidal que crece en forma de células simples o colonias. Pertenece a la división Chlorophyta y a la familia Chlorellaceae (Poddar, Sen y Martin, 2018, pp. 298-309). Se deriva del griego “Chloros” que significa verde debido a su gran contenido de clorofila a y b, por lo que necesita de CO₂, agua, luz y minerales para realizar la fotosíntesis y crecer (replicarse) cada 20 h en 4 células para cualquier sistema de cultivo. Tienen una forma esférica de 2 a 10 μm de diámetro y se adaptan a diferentes rangos de pH y salinidad. Son de interés por su alta capacidad de remover nutrientes del agua y fijar el CO₂ (Sosa, 2019, pp. 13-33).

1.3.2. Cultivo mixotrófico

Técnica que combina las ventajas de los cultivos autótrofos y heterótrofos que se caracteriza por alcanzar una mayor tasa de crecimiento y productividad de la biomasa, lípidos y carbohidratos, al ser un proceso fácil de ampliar, presentar una fase prologada de crecimiento exponencial y la posibilidad de manipular algunos factores que influyen en la composición de la biomasa (Álvarez, García y Folgueras, 2013, pp. 1-10).

1.3.3. Activador

Sustancia capaz de incrementar el desarrollo y el crecimiento vegetativo. Permite mejorar la producción de biomasa, así como la acumulación de carbohidratos y lípidos por parte de las microalgas, al utilizarse como una fuente de carbono adicional en un cultivo mixotrófico. Entre los compuestos utilizados están el eritorbato de sodio, auxinas (ácido naftaleno acético, una hormona vegetal), acetato de sodio, poliaminas (favorecen a la mayor acumulación de monosacáridos), glicerol, entre otros (Meng, Kassim y Cheirsilp, 2020, pp. 51-67).

1.3.4. Dióxido de Carbono

Gas incoloro, inodoro e incombustible que se encuentra en baja concentración naturalmente en la atmósfera de la Tierra, constituye aproximadamente el 0,04 % ,400 partes por millón (IPCC, 2021, pp. 400-500). Además, el CO₂ es el principal contribuyente en el crecimiento microalgal ya que estimula fuertemente la productividad fotosintética en el rango apropiado (Bhola et al., 2016, pp. 401-412).

1.3.5. Pergamino de café

El pergamino de café es la piel plateada alrededor del grano que se obtiene del fruto de la planta del café. Gran cantidad de residuos de esta industria cafetera son desechados, uno de ellos es el pergamino o endocarpio de la semilla que conforma el 11,9 % (base seca) del fruto y que se elimina en la etapa del trillado posterior al proceso de fermentación del grano (Peñaherrera, 2019, pp. 22-31). Esta parte del fruto se caracteriza por su alto valor calórico (4319,98 Kcal/Kg) llegando a competir con el bagazo de la caña de azúcar (4000-5000 Kcal/ Kg) a razón de su gran contenido lignocelulósico, por ello, ha sido estudiado para contribuir junto a los demás residuos agroindustriales a la sustitución de los biocombustibles fósiles por su eficiencia energética (Mera y Simbaña, 2016, pp. 1-7). Finalmente, la composición estructural de las biomásas agrícolas lignocelulósicas comprende a polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina ubicadas en la pared celular (Gómez, 2018, pp. 19-39).

1.3.6. Fase acuosa de la carbonización hidrotermal

Subproducto del proceso HTC que implica un alto contenido de carbono orgánico y nitrógeno, también componentes nocivos como metales pesados. Presenta ácidos orgánicos de cadena corta y amoníaco formados a partir de la hidrólisis, descarboxilación y deshidratación de la biomasa conformada por proteínas, lípidos y carbohidratos durante el proceso.

De la degradación de la celulosa y hemicelulosa, se derivan hidroximetilfurfural (5-HMF) y furfural (FF) respectivamente, pero si estos exceden concentraciones mínimas en la AP provocan la rotura de tricomas (finos crecimientos o apéndices) y lisis celular, además de inhibir la acción normal de la fotosíntesis afectando de forma negativa al crecimiento microalgal. Por último, existen otros compuestos tóxicos aun en mínimas concentraciones como fenoles, amidas cíclicas, aminofenoles y pirazinas (Tarhan et al., 2021, pp. 1-9).

1.3.6.1. Técnicas para la caracterización de la fase acuosa

- **Conductividad y pH**

El rango en el pH de la fase acuosa se encuentra entre 3,7 y 10 por la formación de ácidos orgánicos de cadena corta (ácido fórmico y acético), también por las reacciones de conversión de azúcares y proteínas del contenido celulósico de materia prima en la fase acuosa de la carbonización hidrotermal. Un pH bajo puede señalar la baja concentración de amoníaco y por tanto de proteínas (Tarhan et al., 2021, pp. 1-9).

La conductividad es asociada a la capacidad de hacer fluir electrones o electricidad por la presencia de iones disueltos en una solución, siendo que, un valor alto indica una mayor presencia de iones (Hach Company, 2022, p. 1) .

- **Demanda química de oxígeno (DQO)**

Es la medida de la cantidad de oxígeno que presenta la materia orgánica susceptible de oxidación por medio de un agente químico oxidante fuerte. En otros términos, es la cantidad de oxígeno que requiere el agua para descomponer toda la materia biodegradable o no que lo conforma. La utilización de microalgas ha demostrado ser eficiente en la reducción de DBO y DQO en diversos efluentes (Sosa, 2019, pp. 13-33).

En el análisis de DQO, la muestra se oxida con dicromato de potasio en exceso ácido a 150 °C 2 h, con sulfato de plata como catalizador y sulfato mercurico para eliminar las interferencias de cloruros, reduciendo el ion dicromato (Cr6+) a crómico (Cr3+) color verde. Con el método colorimétrico a 420 nm, se determina la cantidad de Cr6+ remanente. La reacción cambia de verde a rojo (HACH Company, 2000, pp. 188).

- **Demanda biológica de oxígeno (DBO)**

Corresponde a la cantidad de oxígeno que los microorganismos consumen durante la oxidación de materia orgánicas biodegradable en el agua, de hecho, el método respirométrico permite efectuar dicha acción en un mínimo de 5 días (80 % de degradabilidad alcanzada) en un medio oscuro de una solución nutritiva similar a un ambiente natural. Un alto DBO involucra una depreciación del oxígeno disuelto del agua, pudiendo provocar lisis de los microorganismos (Sosa, 2019, pp. 13-33; Hach Company, 2010, p. 8).

Por otro lado, la relación DBO/DQO permite concretar opciones para reducir la carga orgánica de un efluente, siendo que, si es menor a 0,2 indica que la muestra es de carácter inorgánico, donde gran porcentaje de la materia orgánica no es biodegradable biológicamente, por ende, requiere de un tratamiento químico para reducirse; caso opuesto, si el valor esta entre 0,2-0,4 significa que dicha materia orgánica si puede biodegradarse al utilizarse un tratamiento de depuración como cultivos biológicos o lodos activados. Si la relación DBO/DQO es superior a 0,4 muestra que la materia orgánica es muy biodegradable que para erradicarla bastaría de un tratamiento biológico (Ahn, Chang y Yoon, 1999, pp. 2-6).

- **Espectrofotometría de absorción atómica**

Metodología que favorece la determinación de metales en aguas de tipo natural, potable, o residual. Se basa ampliamente en la generación de átomos en estado basal y la medición de la cantidad de energía absorbida por los mismos, siendo directamente proporcional a la concentración de ese elemento en la muestra de interés. Además, resulta eficiente para detectar casi todos los metales pesados con previo tratamiento químico de la muestra (Chávez, 2011, p. 2).

- **Cromatografía líquida de alta resolución**

Técnica cromatográfica en la que participan la fase móvil y estacionaria, inmiscibles entre sí, con la muestra de interés permitiendo la identificación de ácidos orgánicos como el acético, fórmico, láctico y compuestos como furfurales y carbohidratos/polisacáridos (Tarhan et al., 2021, pp. 1-9). Esto gracias, a las distintas fuerzas fisicoquímicas que actúan entre la mezcla que se pretende analizar y que permite reportar valores de retención y separación para cada uno de los componentes (Suarez y Morales, 2018, pp. 1-3).

- **Nitrógeno total Kjeldahl**

El nitrógeno total Kjeldahl corresponde a la suma de compuestos orgánicos nitrogenados y amonio libre, que después de una digestión con ácido sulfúrico y presencia de un catalizador son convertidos en sulfato de amonio. A partir de una destilación en medio alcalino, el amonio es recuperado nuevamente para ser cuantificado. Es necesario diferenciar entre nitrógeno total Kjeldahl (NTK) que abarca al nitrógeno orgánico y amoniacal, del nitrógeno total (NT) que incluye tanto el NTK, como las distintas formas oxidadas del N, además de los nitritos y nitratos (Espinosa, León y Rodríguez, 2013, p. 4).

- **Fósforo total**

El fósforo total es resultado de la suma de este en sus diferentes formas, sean como ortofosfatos o fosfatos orgánicos. Por espectrofotometría, se aplica el método del ácido ascórbico, donde el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio-potasio, en medio ácido, reaccionan con el ortofosfato para formar ácido fosfomolibdico formando un complejo azul de molibdeno cuya intensidad es proporcional a la concentración de P presente, que se mide a 880 nm. La concentración se calcula con una curva de calibración (Nigris et al., 2017, p. 3).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

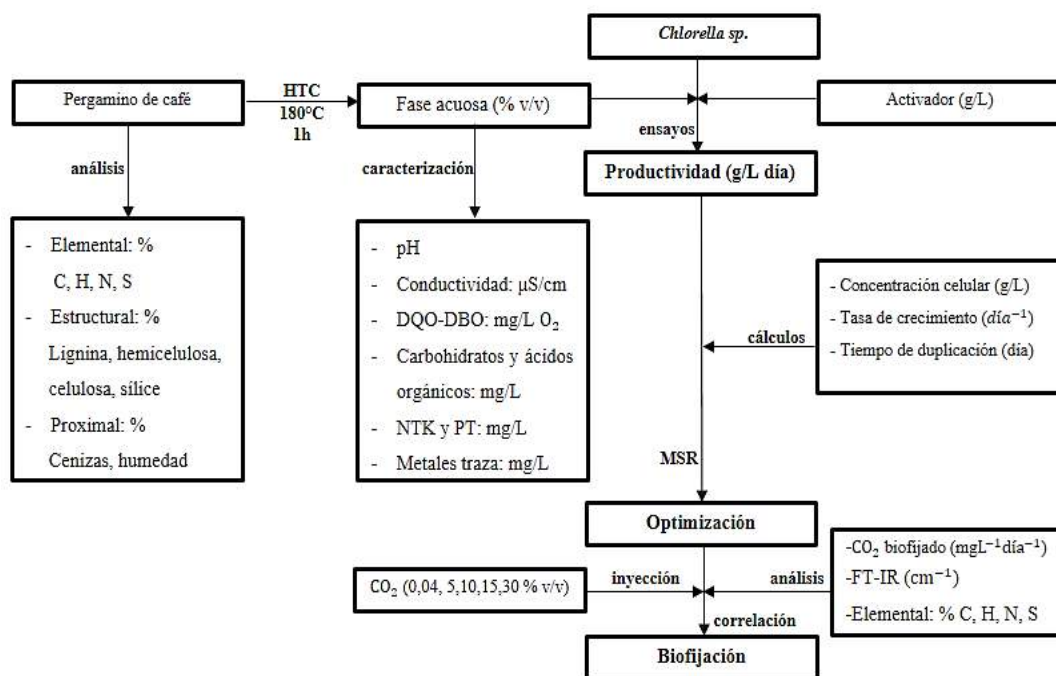


Gráfico 3-2-: Esquema experimental simplificado en el cultivo microalgal.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

- **Tipo de investigación**

De tipo experimental cuantitativo, puesto que se recurrió a la recolección de datos experimentales y al análisis estadístico a fin de rechazar o aceptar la hipótesis planteada.

- **Según el objetivo**

De tipo experimental aplicada, ya que se persiguió una aplicación práctica inmediata al evaluarse la productividad y biofijación de CO₂ en *Chlorella sp.* empleando la fase acuosa HTC y el activador.

- **Según la profundización del objeto de estudio**

De tipo explicativa, pues se recurrió a la descripción, registro, análisis e interpretación de los resultados implicados en el comportamiento microalgal realizando así las conclusiones dominantes.

- **Según la manipulación de variables**

De tipo experimental, debido a que las variables de estudio fueron controladas. Para la etapa I, en dependencia de los diferentes tratamientos con la fase acuosa HTC y el activador se determinó la productividad de biomasa; mientras que, en la etapa II en dependencia de la concentración de CO₂ se midió la biofijación de este gas en las microalgas.

- **Según el tipo de inferencia**

De tipo deductivo, puesto que se estableció conclusiones específicas a partir de premisas generales. Además, los métodos deductivos están asociados a la investigación cuantitativa (Hernández, 2015, pp. 76-118).

- **Según la condición de estudio (por el lugar)**

De laboratorio, en virtud de que se desarrolló en situaciones artificiales trabajándose con diversas concentraciones de fase acuosa HTC, activador y CO₂ para el crecimiento microalgal, por lo que se requirió de equipos y materiales propios de laboratorio.

- **Según el periodo temporal**

De tipo longitudinal, dado que los datos se recolectaron en diferentes puntos del tiempo, estableciéndose una fecha inicial, final y de cosecha para los ensayos microalgales.

2.1. Diseño de la Investigación

2.1.1. Diseño Experimental

Tabla 3-2: Diseño del MSR para el cultivo de microalgas *Chlorella sp.*

# Ensayo	COD			Tratamiento	Factor A	Factor B	X ₁ (g/L)	X ₂ (%v/v)
1	RK1	RK1R	RK1 ₀	1	(-)1	(-)1	0,3	0,9
2	RK2	RK2R	RK2 ₀	a	(+)1	(-)1	0,5	0,9
3	RK3	RK3R	RK3 ₀	b	(-)1	(+)1	0,3	2,6
4	RK4	RK4R	RK4 ₀	ab	(+)1	(+)1	0,5	2,6
5	RK5	RK5R	RK5 ₀	(-)aa	(-)1,414	0	0,2	1,75
6	RK6	RK6R	RK6 ₀	(+)aa	(+)1,414	0	0,6	1,75
7	RK7	RK7R	RK7 ₀	Centro	0	0	0,4	1,75
8	RK8	RK8R	RK8 ₀	(-)ab	0	(-)1,414	0,4	0,5
9	RK9	RK9R	RK9 ₀	(+)ab	0	(+)1,414	0,4	3

Factor A: concentración del activador g/L; Factor B: fase acuosa % v/v; COD: código de ensayos

Fuente: Adaptado a (Vieira et al., 2002, pp. 1-5).

Realizado por: Andrade y Bayas, 2022.

Tabla 4-2: Diseño para el estudio de la biofijación de CO₂ en *Chlorella sp.*

# Ensayo	COD			Factor A	Factor B	Factor C
1	RL1	RL1R	RL1 ₀			5 %
2	RL2	RL2R	RL2 ₀			10 %
3	RL3	RL3R	RL3 ₀	Condición Optimizada		30 %
4	RL4	RL4R	RL4 ₀			15 %

Factor C: concentración de CO₂ en % v/v

Fuente: Adaptado a (Meng y Kassim, 2017, pp. 1-7).

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

Se contó con más de una variable independiente, por lo que se recurrió al método de Superficie de Respuesta del Diseño Compuesto Central (DCC) con 2 factores. Evaluándose en la primera etapa, la concentración de la fase acuosa HTC y el activador para los niveles de las variables que optimizaron la respuesta de la productividad en unidades de g/Ldía (véase tabla 3-2). En la segunda etapa, se estudió la biofijación microalgal a partir de diferentes concentraciones de CO₂ inyectado (véase tabla 4-2), resultados que fueron representados mediante un gráfico de correlación.

En este sentido, la ecuación 7, está definida para el método de superficie de respuesta, donde, (Y) es la variable respuesta, (b) el coeficiente de regresión y (X) son las variables independientes (Vieira et al., 2002, pp. 1-5).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad [7-2]$$

2.2. Identificación de variables

A. ETAPA I de la evaluación de las condiciones óptimas:

Variables independientes:

- Fase acuosa HTC de pergamino de café.
- Concentración del activador.

Variable dependiente:

- Productividad de biomasa microalgal *Chlorella sp.*

Variable interviniente:

- Nutrimientos del pergamino de café.

B. ETAPA II de la biofijación de CO₂:

Variable independiente:

- Concentración de CO₂ (g/L día)

Variable dependiente:

- Biofijación de CO₂ por microalga *Chlorella sp.*

2.3. Localización del Estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biomasa del Instituto de Investigación Geológico y Energético (IIGE) ubicado en la ciudad de Quito.



Figura 1-2: Localización de la presente investigación.

Fuente: Google, 2022.

Organización/ Institución: Laboratorio de Biomasa del Instituto de Investigación Geológico y Energético (IIGE)

Dirección: Av. Geovanny Calles y Padre Luis Vaccari / Unidad de Negocios Transelectric, Carapungo.

Provincia: Pichincha. Cantón: Quito

Teléfono: (593) 023931390 Ext.: 1591

Dirección Web: www.geoenergia.gob.ec

2.4. Población de estudio

La cepa fue obtenida del reservorio de Cumbayá-Quito, aislada en medio de cultivo enriquecidos en nutrientes (N, P, K, y elementos traza); se conservaron en bacto agar al 1,5% para posteriores estudios y cuyo contenido fue alrededor de 10^6 células por mililitro.

2.5. Tamaño de la muestra

La muestra de microalgas representó el 10% de los reactores de cultivo a estudiar (cultivos en lotes, 250 mL) y se obtuvo a partir de un cultivo iniciador adaptado a condiciones de estrés con CO_2 .

2.6. Método de muestreo

Se realizó un muestreo probabilístico por conglomerados, donde, la unidad muestral lo conformó el conglomerado de microalgas *Chlorella sp.* con el cual se logró el acceso a la unidad de análisis de esta.

2.7. Técnicas de recolección de datos

- Para la recolección directa y registro de los datos de la caracterización tanto de la biomasa del pergamino de café antes y después de su tratamiento HTC, de la fase acuosa y de la biomasa microalgal se lo realizaron guiadas en la experimentación en acción de acuerdo con las normativas NREL.
- Para la codificación y registro de los datos de los cultivos microalgales se realizó por la observación directa de los hechos por las autoras (investigador-objeto de estudio) y de acuerdo con el control de cinética celular o densidad óptica mediante un espectrofotómetro UV-Vis (680 nm), en el cual se tomaron mediciones de la absorbancia cada 24 h por 11 días. Posteriormente, se utilizó un software estadístico en el que se introdujeron los datos observados, esto con el fin de obtener los diferentes parámetros relacionados con la superficie de respuesta considerando las variables en la etapa I.
- Para la recolección de datos en la etapa II, se empleó un software estadístico en el que se introdujeron los datos guiados por la experimentación en acción de los análisis elementales de carbono realizados a los cultivos por lotes en condiciones optimizadas para la determinación de la biofijación de CO₂.

2.8. Análisis estadístico inferencial

Inicialmente, se realizó un análisis de normalidad, a continuación, para conocer los niveles que permitieron optimizar la productividad teórica de biomasa considerando las variables definidas en la Etapa I, se utilizó el software estadístico Statgraphics 19 para construir el diseño de superficie de respuesta y obtener la prueba paramétrica de análisis de varianzas ANOVA de dos vías; como información adicional se obtuvo el coeficiente de correlación, optimización, diagrama de Pareto, gráfica de superficie de respuesta y el gráfico de interacción para su posterior análisis e interpretación y respaldo. Por último, para evaluar la biofijación de CO₂ en las microalgas se graficó la correlación de las variables definidas en la Etapa II.

2.9. Métodos

2.10. Preparación de la fase acuosa de pergamino de café mediante HTC

La preparación de la fase acuosa de pergamino de café por el proceso de carbonización hidrotermal requirió los materiales, reactivos y equipos que se indica en la tabla 5-2.

Tabla 5-2: Materiales, reactivos y equipos para la obtención de la fase acuosa HTC.

Materiales	Reactivos/Materia prima	Equipos
-Vaso de precipitación	25 mL	-Agua destilada o tipo I
	100 mL	-Balanza analítica (BOECO)
-Probeta	100 mL	-Pergamino de café
		10 g
		-Carbonizador hidrotermal de 200 mL (Techinstro)
-Recipiente ámbar	100 mL	-Hielo (ThermoSafe)
		-Estufa (SN-55 memmert)
-Caja Petri		-Bomba de vacío (ROCKER-300)
-Espátula		-Incubadora de CO ₂ (BINDER)
-Bandeja plástica		-Frigorífico (ECASA)

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

2.10.1. Proceso de obtención de la fase acuosa

Se mezcló 10 g de pergamino de café en 100 mL de agua tipo I con una proporción 1:10 en un carbonizador hidrotermal de acero inoxidable (Techinstro) con capacidad de 200 mL. Para el tratamiento, se introdujo el carbonizador hidrotermal en una estufa a condiciones de 180 °C por 1 h. Para menguar el calor absorbido, se colocó en baño con hielo hasta alcanzar una temperatura ambiente. Se empleó la filtración al vacío por 15 minutos para separar la fase sólida (biochar) de la fase líquida. Finalmente, el producto sólido se recogió en una caja Petri y se secó a 60 °C por 24 h, mientras que la fase líquida, se almacenó en un recipiente ámbar a 4 °C hasta su uso.

2.11. Etapa I de la evaluación de las condiciones óptimas

2.11.1. Curva de calibración estándar

Se generó curvas estándar por triplicado de la densidad óptica (OD) frente a la concentración de biomasa microalgal (g/L) a partir del cultivo iniciador con absorbancia de 0,837 medida a 680 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (HACH/Thermo Scientific).

Al final de la fase exponencial del ciclo de crecimiento. Se filtró una alícuota de 20 mL de este cultivo a través de membranas de celulosa de 0,45 μ m. Previamente, los filtros fueron secados en condiciones de 80 °C por 72 horas hasta un peso constante. Después de la filtración, las células fueron lavadas con 5 mL de agua destilada para remover las sales presentes. Los filtros con la muestra de *Chlorella sp* fueron secados a 65 °C en una incubadora hasta peso constante. El cultivo de *Chlorella sp*. fue mezclado y diluido serialmente (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) en un volumen total de 10 mL y la OD de las diluciones fue medida a 680nm (véase tabla 14-3). Se calculó el peso seco por volumen a partir del volumen conocido del cultivo (20 mL). Finalmente, se escogió la curva de calibración con el coeficiente de correlación más alto y su respectiva ecuación se utilizó para la cuantificación posterior de la biomasa microalgal (véase gráfico 4-3).

2.11.2. Preparación del cultivo

- **Cepa de *Chlorella sp*.**

La cepa aislada de la microalga *Chlorella sp*. (véase figura 2-2) fue proporcionada por el laboratorio de biomasa del IIGE. A partir de esta cepa conservada a bajas temperaturas, se generó el inóculo iniciador para los ensayos posteriores.



Figura 2-2: Cepa de *Chlorella sp*. cultivada al 1,5% en bacto-agar y al 18 % de CO₂.

Fuente: Laboratorio de Biomasa IIGE, 2022.

- **Preparación del cultivo madre**

Se preparó el cultivo madre en un fotobiorreactor (New Brunswick–BioFlo/CelliGen 115) con agitación continua de 40 rpm en un volumen total de 5000 mL y a una concentración de 2500 ppm NPK más elementos traza, 20 ppm de KNO₃, inóculo al 10 % y flujo de CO₂, tal como se puede observar en la figura 3-2.



Figura 3-2: Fotobiorreactor con cultivo de *Chlorella sp.*

Fuente: Laboratorio de Biomasa IIGE, 2022.

- **Preparación inóculo**

A partir de la solución madre, por dilución se preparó el inóculo a utilizar en los cultivos por lotes, se requirió de un medio de cultivo al 0,1 % con fertilizante NPK (0,4 g) y activador (0,08 g) a un volumen final de 400 mL con agua destilada. Se autoclavó a 121 °C y se redujo el valor de la absorbancia a 0,4-0,5, al sustituir una parte del volumen del medio de cultivo por el inóculo madre. En la tabla 6-2 se detalla la composición del fertilizante NPK comercial que formó parte de la disolución acuosa.

Tabla 6-2: Composición del fertilizante comercial.

Componentes mayoritarios	Porcentaje (% p/p)	Componentes minoritarios
Nitrógeno (N)	10	-Hormonas de crecimiento: Giberelinas activas (3,8-10 ppm), auxinas activas (14.7-17.5 ppm), citoquininas activas (1,25 -1,56 ppm).
Fósforo (P_2O_5)	40	
Potasio (K_2O)	10	
Boro (B)	0,02	
Cobre (Cu)	0,05	-Vitaminas: Biotina (trazas), caroteno (3-10 ppm), vitamina E (0,23 ppm), vitamina C (0,15- 3 ppm), vitamina B1 (227 ppm), vitamina B3 (0,13 ppm), vitamina B5 (0,01 ppm), riboflavina (0,01 ppm).
Hierro (Fe)	0,10	
Manganeso (Mn)	0,05	
Molibdeno (Mo)	0,0005	
Zinc (Zn)	0,05	

Fuente: ECUAQUÍMICA, 2022.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

- **Preparación cultivo por lotes**

Los cultivos por lotes se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL al 10% en la concentración inicial del inóculo en mezcla con una disolución acuosa de activador y AP, previamente autoclavada a 121° o 15 psi.

Lo ensayos fueron continuamente aireados al flujo máximo de las bombas air pump S4000B por capilares de vidrio dispuestos en el corcho que cubría a los matraces. El aire se filtró en membranas PTFE de 0,2µm y se eliminaron las gotas.

Además, los cultivos se iluminaron con lámparas fluorescentes que proporcionaban una iluminancia de 1000 lux. Finalmente, se mantuvieron a temperatura ambiente y se realizó un control de cinética celular cada 24 horas mediante un espectrofotómetro UV-Vis (HACH/Thermo Scientific) a 680 nm por 11 días consecutivos; tomando 3,5 mL del medio (por triplicado) en ambiente aséptico. Los cultivos se diluyeron a una OD de menos de uno, para estar dentro del rango lineal de medición y la OD real se determinó multiplicando por el factor de dilución.

La tabla 7-2 indica los materiales, reactivos y equipos utilizados en el cultivo microalgal de la etapa I. El anexo A muestra el seguimiento diario de los cultivos ensayados.

El volumen de fase acuosa HTC y los gramos de acetato de sodio utilizados en los tratamientos de la Etapa I se detalla en la tabla 8-2.

Tabla 7-2: Materiales, reactivos y equipos para el cultivo de *Chlorella sp.*

Materiales		Equipos
- Micropipetas	mL- µL	-Espectrofotómetro UV-Vis (HACH/Thermo Scientific)
- Probetas	100mL	- Cámara de flujo laminar
- Puntas de micropipeta	mL- µL	-Fotobiorreactor (New Brunswick –BioFlo/CelliGen 115)
-Vaso de precipitación	50mL	-Bomba de aire (Air-Pump S-4000B)
-Erlenmeyer	250mL	-Manta calefactora (98-II Heating Mantles)
-Corchos		-Centrífuga (SORVALL ST 16 Centrifuge)
-Papel aluminio		Reactivos
-Filtros PTFE		- Acetato de sodio
-Mechero		-Etanol 70 %
-Capilares de vidrio		-Inóculo de <i>Chlorella sp.</i>
-Lámparas fluorescentes		

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

Tabla 8-2: Codificación y valores experimentales para el cultivo de *Chlorella sp.*

Tratamiento	Código			V inóculo (mL)	V X ₂ (mL)	Wt X ₁ (g)	V H ₂ O (mL)
1	RK1	RK1R	RK1 ₀	25	2,25	0,075	222,75
a	RK2	RK2R	RK2 ₀	25	2,25	0,125	222,75
b	RK3	RK3R	RK3 ₀	25	6,5	0,075	218,5
ab	RK4	RK4R	RK4 ₀	25	6,5	0,125	218,5
(-)aa	RK5	RK5R	RK5 ₀	25	4,375	0,05	220,625
(+)aa	RK6	RK6R	RK6 ₀	25	4,375	0,15	220,625
Centro	RK7	RK7R	RK7 ₀	25	4,375	0,1	220,625
(-)ab	RK8	RK8R	RK8 ₀	25	1,25	0,1	223,75
(+)ab	RK9	RK9R	RK9 ₀	25	7,5	0,1	217,5

X₁: peso (g) de acetato de sodio X₂: volumen (mL) de fase acuosa (AP)

Fuente: Adaptado a (Vieira et al., 2002, pp. 1-5).

Realizado por: Andrade y Bayas, 2022.

• Cosecha microalgal

Al onceavo día de cultivo, se recuperó el volumen inicial de 250 mL con agua destilada. Cada uno de los ensayos se colocaron en tubos de centrifuga de 50 mL, y se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min. Se retiró el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur y se depositó los pellets en cajas Petri previamente esterilizadas en una estufa a 105 °C por 2 horas. Las microalgas recogidas se secaron a 60 °C en una incubadora por 24 horas, se pesó hasta obtener un valor constante y por diferencia de estos, se registró el peso en seco de las microalgas cultivadas.

2.11.3. Cuantificación de la concentración de biomasa microalgal por densidad óptica

Se determinó utilizando la ecuación de la curva de calibración ($y=mx+b$), obtenida por diluciones seriales con los datos de la OD diaria y su relación con la concentración de biomasa (g/L), donde, (y) es la absorbancia promedio de cada ensayo, (m) es la pendiente, (b) el intercepto y, (x) es la concentración investigada (véase gráfico 4-3).

2.11.3.1. Tiempo de duplicación y tasa de crecimiento

A partir de la concentración de biomasa celular de cada ensayo, se determinó el tiempo de duplicación (t_d) y tasa de crecimiento (μ) aplicando la ecuación 4-1 y 5-1 respectivamente.

2.11.4. Cálculo de la productividad de biomasa microalgal

La productividad de biomasa de cada tratamiento microalgal se obtuvo aplicando la ecuación 3-1 para posterior análisis estadístico.

2.11.5. Análisis estadístico etapa I

Los puntos calculados en la tabla 9-2 permitieron optimizar la productividad en el gráfico de superficie de respuesta. Además, se realizó un análisis de la probabilidad normal, ANOVA, optimización, Pareto, coeficiente de correlación y gráfico de interacción.

Tabla 9-2: Puntos experimentales para la fase acuosa y activador.

Factor []	Simbología	Niveles				
		Axial negativo	Bajo	Centro	Alto	Axial positivo
Acetato de sodio	Activador g/L	-1,414	-1	0	+1	+1,414
		0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
		Centro: $\frac{0,6+0,2}{2} = 0,4$				
		Alto: $\frac{0,6-0,4}{1,414} = 0,14 + 0,4 = 0,54 \approx 0,5$				
		Bajo: $\frac{0,4-0,2}{1,414} = 0,4 - 0,14 = 0,26 \approx 0,3$				
Fase acuosa del pergamino de café HTC	AP %v/v	-1.414	-1	0	+1	+1,414
		0,5	0,9	1,75	2,6	3,0
		Centro: $\frac{3,0+0,5}{2} = 1,75$				
		Alto: $\frac{3,0-1,75}{1,414} = 0,88 + 1,75 = 2,63 \approx 2,6$				
		Bajo: $\frac{1,75-0,5}{1,414} = 1,75 - 0,88 = 0,87 \approx 0,9$				

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

2.12. Etapa II de la biofijación del CO₂

Al igual que en la etapa I, los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL al 10% en la concentración inicial del inóculo en mezcla con una disolución acuosa de activador y AP optimizados, previamente autoclavada a 121° o 15 psi. Cada ensayo se realizó por triplicado y bajo las mismas condiciones de temperatura, medio de cultivo, tiempo e iluminancia.

La experimentación se llevó a cabo con cuatro diferentes flujos de mezclas de Aire-CO₂ (5, 10, 15 y 30 % v/v) que se ajustó con un mezclador de gases (MCQ instrument/ GB3000); además, se incorporaron difusores para homogenizar el burbujeo. La tabla 10-2 muestra las condiciones experimentales a estudiar en la etapa II, siendo la cantidad de fase acuosa HTC y acetato de sodio los niveles óptimos resultantes del MSR.

Tabla 10-2: Condiciones para el estudio de la biofijación de CO₂ en *Chlorella sp.*

Código			Vol, inóculo (mL)	V, X ₂ (mL)	Wt, X ₁ (g)	V H ₂ O, (mL)	CO ₂ (%)
RL1	RL1R	RK1 ₀	25	3,290	0,05	221,710	5
RL2	RL2R	RK2 ₀	25	3,290	0,05	221,710	10
RL3	RL3R	RL3 ₀	25	3,290	0,05	221,710	30
RL4	RL4R	RL4 ₀	25	3,290	0,05	221,710	15

X₁: peso (g) de acetato de sodio **X₂:** volumen (mL) de fase acuosa (AP)

Realizado por: Andrade y Bayas, 2022.

• Parámetros cinéticos del crecimiento

La cuantificación de la concentración de biomasa por OD, el tiempo de duplicación, la tasa de crecimiento, la cosecha microalgal y la productividad de biomasa se determinaron acorde a lo descrito en la etapa I.

2.12.1. Cálculo de la biofijación de CO₂ en *Chlorella sp.*

La biofijación de CO₂ (mgL⁻¹día⁻¹) se calculó a partir de la productividad y el contenido de carbono asimilado por las microalgas durante los cultivos como se indica en la ecuación 6-1.

2.12.2. Análisis elemental de *Chlorella sp.*

El contenido porcentual de carbono, hidrogeno, nitrógeno y azufre de la biomasa microalgal cosechada se obtuvieron mediante un analizador elemental (PerkinElmer 2400 CHNS/O Organic Elemental Analyzer) bajo la norma BS EN 15104.2011.

2.12.3. Análisis estadístico Etapa II

Una vez obtenidos los valores experimentales de la etapa II, se utilizó un software estadístico para graficar la correlación entre el porcentaje de CO₂ inyectado y la biofijación de éste en *Chlorella sp.*

2.13. Caracterización del pergamino de café

La biomasa de pergamino de café fue receptada de la hacienda Puntas Hurco ubicada en Pacto al Noroccidente de Pichincha y corresponde a la variedad híbrida *Sarchimor* por el cruce de dos progenitores de café Arábigo genéticamente distintos.

2.13.1. Análisis elemental del pergamino de café

La muestra de pergamino de café fue combustionada en medio de oxígeno puro convirtiendo a sus componentes moleculares en gases simples (CO_2 , N_2 , H_2O y SO_2) y que fueron transportados mediante un gas portador (He) a través de un horno de reducción. La técnica funcionó mediante el uso de una columna cromatográfica, donde se produjo la separación de los distintos elementos, concluyendo con su paso por un detector de conductividad térmica (D.C.T.) que originó una señal directamente proporcional a la concentración de cada uno de los componentes. Se empleó un analizador elemental automatizado (PerkinElmer 2400 CHNS/O Organic Elemental Analyzer) para C, H, N, S, presentes simultáneamente en el material orgánico bajo la norma BS EN 15104.2011.

2.13.2. Análisis estructural (lignina, hemicelulosa y celulosa)

En el análisis de lignina y celulosa se trabajó con una muestra de pergamino de café con y sin tratamiento HTC previamente desengrasada con dietiléter en sistema de sifón y secada a temperatura ambiente en el Laboratorio de Bromatología de la ESPOCH, utilizando un extractor de fibra (Dosi-Fiber de J.P. Selecta) y siguiendo el procedimiento descrito en el manual de instrucciones código 80055 Rev B (J.P. Selecta S.A., 2012, pp. 17-21).

Este análisis se basó en la determinación fraccionada con una solución ácido-detergente (20 g bromuro de cetiltrimetilamonio en 1 L de ácido sulfúrico 1N), un antiespumante (octanol), ácido sulfúrico 72 %, ácido bromhídrico 48 % y acetona. Se obtuvo los resultados en duplicado por diferencia de pesos utilizando una balanza analítica (OHAUS Explorer) con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{W_5 - W_7}{W_0} * 100 \quad [8-2]$$

$$\% \text{ Lignina} = \frac{W_7 - W_8}{W_0} * 100 \quad [9-2]$$

$$\% \text{ Sílice} = \frac{W_9}{W_0} * 100 \quad [10-2]$$

Donde:

W_0 : es el peso (g) de la muestra inicial seca de 1 g en el crisol poroso de 30 mL

W_5 : es el peso (g) de la muestra secada a 150 °C posterior a haber estado en el equipo de Dosi-Fiber con 100 mL de solución ácido-detergente por 1 h a temperatura controlada de 90 (hasta hervor) a 50 °C, lavado y filtrado con agua destilada caliente 3 veces. Las columnas de cristal Disi-Fiber estuvo refrigeradas (Recirculating Chiller CCA-420/ BIOBASE) en la parte superior a 10 °C para contender con el calor condicionado.

W_7 : es peso (g) de la muestra con peso W_5 puesta a extracción en frío en el Dosi-Fiber con 25 mL de ácido sulfúrico 72 %, lavado y filtrado con agua destilada 3 veces y, secado a 150 °C por 1 h. Representa a la lignina y minerales.

W_8 : es el peso (g) de la muestra W_7 colocada a incineración en una mufla a 500 °C por un mínimo de 3 h. Representa a minerales (sílice y cenizas ácido-detergentes).

W_9 : es el peso (g) de la muestra W_8 puesta con 4 mL de HBr 48% por 1,5 h en el Dosi-Fiber, lavado con agua destilada, secada e incinerada por mínimo 3 h en la mufla.

El porcentaje de hemicelulosa en la muestra de pergamino de café se lo determinó por diferencia.

2.13.3. *Análisis proximal*

- **Cenizas:** Se realizó por el método de secado en una mufla bajo la norma NREL/TP-510-42618. La muestra de pergamino de café se colocó en un crisol (secado y pesado a 60 °C por 24 h) que se llevó a una mufla a 120, 180, 400 °C en periodicidad de 1 h y, posteriormente a 575 °C por 24 h. Se pasó al desecador por 20 min y se pesó hasta valor constante. Se ejecutó por triplicado. (Sluiter, Hames, Ruiz, et al., 2008, pp. 5-7).

$$\%Cenizas = \frac{\text{Peso crisol más ceniza} - \text{Peso crisol vacío}}{\text{Peso muestra inicial}} \times 100 \quad [11-2]$$

- **Humedad:** Se realizó a través de la pérdida de peso empleando una termobalanza (TecnoEscala) bajo la norma NREL/TP-510-42621. El porcentaje se obtuvo de manera semiautomatizada y por triplicado (Sluiter, Hames, Hyman, et al., 2008, pp. 3-5).

El análisis de cenizas y de humedad se realizó en el Laboratorio de Química Analítica de la ESPOCH.

2.14. Caracterización de la fase acuosa HTC

2.14.1. Conductividad y pH

El multiparámetro (OAKTON/PC-2700) permitió medir tanto el pH como la conductividad de la AP proveniente de la carbonización hidrotermal.

2.14.2. Demanda química de oxígeno

En el análisis de la demanda química de oxígeno (DQO), gran parte de la materia orgánica presente en la fase acuosa fue oxidada por una solución en exceso de dicromato de potasio en ácido sulfúrico y con temperatura de incubación de 160 °C por 2 h en un termorreactor (VELP Científica/ Eco-16 Thermoreactor) a rango alto de análisis (20-1500 ppm); la cantidad de $K_2Cr_2O_7$ remanente fue medido en un colorímetro (HACH/DR-2800). Debido a la alta carga de materia orgánica en la muestra fue necesario realizar previamente diluciones (10:100 y 1:2) resultando en un factor de dilución total de 20. Después, se procedió a tomar los 2 mL de la muestra diluida y se colocó en un vial con solución digestora, la cual contenía sulfato de mercurio (II), ácido sulfúrico 83 % y sulfato de plata como catalizador.

El análisis de DQO como de DBO se realizaron en el Laboratorio de la Calidad del Agua de la ESPOCH.

2.14.3. Demanda biológica de oxígeno

La demanda biológica de oxígeno (DBO) al ser un análisis empírico de tipo biológico permitió medir el CO_2 generado por los microorganismos en la degradación de la materia orgánica al cabo de un largo periodo. La fase acuosa fue incubada por 6 días a 20 °C en oscuridad para prevenir interferencias. Se empleó un frasco ámbar para DBO (Winkler) de un volumen aproximado de 250-300 mL incorporado de un agitador magnético, una solución nutritiva en un digestor o respirómetro (HACH BOD Track II) y con control termostático a 20 °C. Debido a la alta carga de materia orgánica en la muestra, se realizó previamente diluciones (10:100 y 50:50) resultando como factor de dilución total de 20. Finalmente, se tomó 95 mL de la muestra diluida para el análisis, estimando que la concentración DBO es de rango alto (0-700 ppm) como indicó el equipo, luego, se adicionó 50 mL de una solución nutritiva y finalmente se conectó al respirómetro.

La solución nutritiva se preparó con los reactivos y volúmenes indicados en la tabla 11-2.

Tabla 11-2: Reactivos de la solución nutritiva para DBO.

Reactivos	Volumen (mL)
Solución de cloruro férrico	10
Solución de sulfato de magnesio	10
Solución de cloruro de calcio	10
Solución bufer pH 7 grün 20 °C	20

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

2.14.4. Cuantificación de ácidos orgánicos y carbohidratos

Para la determinación de ácidos orgánicos (ácido láctico y acético) y carbohidratos (glucosa, xilosa y celobiosa) se lo realizó mediante HPLC (1260 Infinity Agilent) con una columna de intercambio catiónico (REZEX ROA 8% H 300x7.8 mm 10 µm). Se empleó como eluyente H₂SO₄ (0,0025 M) a un flujo de 0,44 mL/min a una temperatura de 30°C, con un volumen de inyección de 10 µL, y un detector RID. La curva de calibración externa estuvo en un rango de 0,1 a 10 g/L. Los materiales, equipos y reactivos para este análisis de la fase acuosa HTC se indican en la tabla 12-2. El anexo C indica los resultados reportados en detalle.

Tabla 12-2: Materiales, equipos y reactivos para el análisis de ácidos orgánicos y carbohidratos.

Materiales	Reactivos Analíticos	Equipos
-Balón de aforo	5,0 mL	-Ácido láctico 0,1661 g
-Viales	2,0 mL	-Ácido acético 0,1526 g
		-Ácido sulfúrico
-Micropipeta	1000 µL	
-Vaso de precipitación	50 mL	-Glucosa 0,0334 g
-Jeringas	5,0 mL	-Xilosa 0,0323 g
-Filtros PTFE	0,2 µm	-Celobiosa 0,0316 g
		-Etanol 0,0751 g
		-Agua tipo I 2,0 L
		-AP 5,0 mL

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

2.14.5. Macroelementos

2.14.5.1. Nitrógeno Kjeldahl total (TNK)

Para analizar el nitrógeno total se empleó el método estándar 4500-N/ Kjeldhal con un límite de detección de 0,003%, y que correspondió a la suma del nitrógeno orgánico y el nitrógeno amoniacal, sin considerar el nitrógeno en sus distintas formas como azida, hidrazona, nitrilo, nitro, nitrato, u oxima, etc. El principio se basó en la mineralización que dio lugar al sulfato de amonio, posteriormente se generó la liberación del amonio, se destiló y finalmente se determinó a partir de una valoración. Siendo así que se trató la muestra con ácido sulfúrico con un alto contenido de sulfato potásico, a fin de elevar el punto de ebullición de la mezcla, en presencia de selenio, que actuó como catalizador. Después, se adicionó un álcali para la liberación del ion amonio a partir del sulfato de amonio y la destilación sobre una solución indicadora con ácido bórico. La determinación final se llevó a cabo por valoración directa (APHA, 1999, pp. 1-10).

Este análisis se realizó en la empresa Labolab. El anexo B y la tabla 25-3 muestran detalles de los resultados.

2.14.5.2. Fósforo total (PT)

Los materiales, equipos y reactivos para el análisis de fósforo total de la fase acuosa HTC del pergamino de café se indican en la tabla 13-2.

Tabla 13-2: Materiales, equipos y reactivos para el análisis de fósforo total.

Materiales	Reactivos Analíticos	Equipos
-Balón de aforo	25 mL -Molibdato de amonio	60 g -Balanza analítica
	-Tartrato de antimonio	-Espectrofotómetro UV-
-Viales	10 mL y potasio	1,455 g Vis (Thermo Scientific
-Micropipeta y		Evolution 220)
puntas	3 mL -Ácido sulfúrico	700 mL
-Vaso de		
precipitación	50 mL -Ácido ascórbico	132 g
	-Agua destilada o tipo I	2 L

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

Para este método colorimétrico se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Evolution 220). Se realizó una dilución de 0,5:5 resultando como factor de dilución 10. Posteriormente, se preparó la solución patrón destinada para el análisis de fósforo con 0,875 mL de la solución A y 0,250 mL de la solución B y se aforó en un balón de 25 mL. Se verificó que el color de la solución aforada tienda a una tonalidad amarillenta y no gris o verdoso. Después, se mezcló la muestra diluida con la solución patrón en un vial y se dejó reposar por 15 min para que ocurra la reacción. La muestra se tornó azul como indicativo de la presencia de fósforo. Finalmente, se midió un blanco de agua destilada y la muestra preparada a 880 nm. El contenido de fósforo se obtuvo utilizando la curva de calibración del gráfico 3-2 preparada por el laboratorio de Investigación de la ESPOCH de acuerdo con los datos expuestos en la tabla 14-2.

Tabla 14-2: Datos de la curva de calibración para el análisis del contenido de fósforo.

X (ppm)	Y (Abs)
0,100	0,042
0,400	0,113
0,800	0,224
1,200	0,346
2,000	0,563
Pendiente	0,277
Intersección	0,008

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

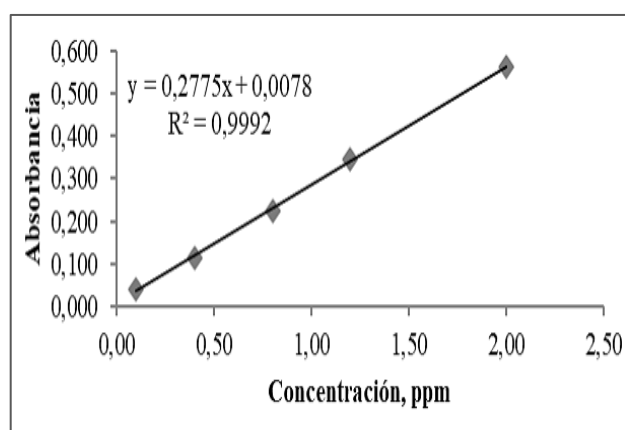


Gráfico 3-2: Curva de calibración para el análisis del contenido de fósforo.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

La solución A fue preparada de la siguiente manera:

1. Disolver 60 g de molibdato de amonio en 200 mL de agua.
2. Añadir 1,455 g de tartrato de antimonio y potasio. Disolver.
3. Añadir de forma lenta y con agitación suave 700 mL de ácido sulfúrico concentrado.
4. Dejar enfriar y diluir a un 1 L de agua. Guardar en la nevera.

La solución B fue preparada de la siguiente manera:

Disolver 132 g de ácido ascórbico en un volumen de 1 L con agua. Guardar en la nevera.

2.14.6. Micronutrientes (metales traza) y nutrientes secundarios

La técnica instrumental empleada correspondió a la espectrofotometría de absorción atómica en un equipo Perkin Elmer PinAAcle 900T siguiendo la Normativa AOAC (véase tabla 15-2); con la cual, los átomos presentes en la llama fueron capaces de absorber parte de la radiación, lo que causó una disminución en la señal y ese dato es el que fue medido por el detector y, transformado posteriormente en un valor de concentración. Siendo así que, se analizaron los nutrientes secundarios (Ca, Mg) y micronutrientes (Cu, Fe, K, Na, Zn). Este análisis se realizó en el departamento de ciencia, alimentos y biotecnología (DECAB) de la EPN. El anexo D y tabla 25-3 muestran los resultados a detalle.

Tabla 15-2: Metodología para el análisis de metales traza.

Analito	Método
Ca	AOAC Official Method 991.25 Calcium, Magnesium y Phosphorus in Cheese Atomic Absorption Spectrometric and colometric methods
Cu	AOAC Official Method 971.20 Cooper and Nickel in Tea: Atomic Absorption Spectrometric Method
Fe	AOAC Official Method 971.20 Cooper and Nickel in Tea: Atomic Absorption Spectrometric Method
Mg	AOAC 991.25 Calcium, Magnesium y Phosphorus in Cheese Atomic Absorption Spectrometric and colometric methods
K	AOAC Official Method 977.29 Calcium, Potassium and Sodium in electrolyte replenshers.
Na	AOAC Official Method 977.29 Calcium, Potassium and Sodium in electrolyte replen
Zn	AOAC Official Method 971.20 Cooper and Nickel in Tea: Atomic Absorption Spectrometric Method

Fuente: Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología EPN, 2022.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

2.15. Análisis FT-IR de la biomasa microalgal

En el espectrofotómetro FT-IR (JASCO FT/IR-4100) se hizo un barrido de 4000 a 520 cm^{-1} , además, vino incorporado una unidad de ATR (Reflectancia total atenuada), un cristal pequeño donde se colocó la muestra. El haz de radiación infrarrojo fue emitido en dirección al cristal de seleniuro de zinc hasta llegar al detector. Las microalgas secas fueron colocadas directamente, obteniéndose el espectro buscado para su posterior interpretación. El análisis espectrofotométrico se llevó a cabo en el laboratorio de Instrumental I de la ESPOCH.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE DISCUSIÓN Y RESULTADOS

3.1. Resultados de la Etapa I o de la evaluación de las condiciones óptimas

3.1.1. Curva de calibración del crecimiento microalgal

Tabla 16-3: Datos para la relación lineal a OD_{680nm}

Factor de dilución	X (g/L)	Y Absorbancia
1:32	0,0098	0,0316
1:16	0,0197	0,0574
1:8	0,0394	0,1108
1:4	0,0788	0,2166
1:2	0,1575	0,4286
Stock	0,3150	0,8313
	Pendiente	2,6253
	Intersección	0,0080

Elaborado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

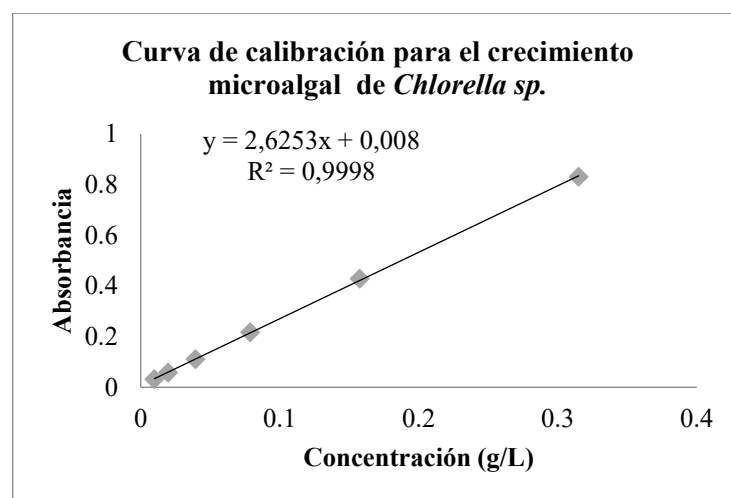


Gráfico 4-3: Relación lineal a OD_{680} entre la concentración y la absorbancia.

Elaborado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

En el gráfico 4-3 y tabla 16-3, se muestra la curva de calibración utilizada para la cuantificación de la biomasa microalgal; la concentración expresada en g/L (eje x) y la absorbancia (eje y). Se trabajó experimentalmente con absorbancias menores a uno a fin de mantener la linealidad de los datos.

3.1.2. Cinética de crecimiento y cuantificación de la biomasa

Tabla 17-3: Resultados de la concentración de biomasa celular, ensayos RK1-RK9.

TIEMPO (días)	RK1	RK2	RK3	RK4	RK5	RK6	RK7	RK8	RK9
Concentración celular (g/L)									
0	0,015	0,018	0,015	0,016	0,016	0,016	0,018	0,018	0,019
	±0,000	±0,000	±0,000	±0,001	±0,000	±0,000	±0,000	±0,000	±0,000
1	0,046	0,035	0,050	0,049	0,045	0,033	0,036	0,034	0,037
	±0,001	±0,001	±0,001	±0,000	±0,001	±0,001	±0,000	±0,000	±0,000
5	0,405	0,260	0,480	0,415	0,470	0,259	0,262	0,258	0,278
	±0,001	±0,000	±0,002	±0,001	±0,002	±0,002	±0,007	±0,005	±0,004
6	0,464	0,260	0,520	0,518	0,522	0,251	0,261	0,260	0,280
	±0,001	±0,003	±0,002	±0,002	±0,001	±0,004	±0,004	±0,001	±0,001
7	0,529	0,256	0,574	0,553	0,582	0,248	0,263	0,264	0,284
	±0,001	±0,002	±0,001	±0,004	±0,001	±0,001	±0,001	±0,000	±0,003
11	0,641	0,262	0,752	0,722	0,774	0,247	0,275	0,298	0,285
	±0,004	±0,001	±0,002	±0,002	±0,003	±0,000	±0,003	±0,001	±0,002
TIEMPO (días)	RK1 ₀	RK2 ₀	RK3 ₀	RK4 ₀	RK5 ₀	RK6 ₀	RK7 ₀	RK8 ₀	RK9 ₀
Concentración celular ensayos réplica-control (g/L)									
0	0,015	0,018	0,015	0,016	0,016	0,016	0,018	0,018	0,019
	±0,000	±0,000	±0,000	±0,001	±0,000	±0,000	±0,000	±0,000	±0,000
11	0,797	0,355	0,651	0,603	0,766	0,353	0,391	0,348	0,387
	±0,001	±0,001	±0,001	±0,000	±0,001	±0,001	±0,001	±0,000	±0,000

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

En la tabla 17-3 se muestra los resultados de las concentraciones (g/L) de la biomasa celular calculados a OD_{680nm} de los ensayos normales (RK), réplicas (RKR), y réplica-control (RK₀). Los cultivos iniciaron con una concentración próxima a 0,015 g/L. En el gráfico 5-6 del perfil de crecimiento, se dedujo que no hubo inhibición en el desarrollo de *Chlorella sp.* De hecho, los ensayos RK1-RK5 mantuvieron una tendencia exponencial tras 11 días de cultivo con concentraciones alrededor de 0,06-0,08 g/L, y en los ensayos RK6-RK9-(RK₂) la fase exponencial ocurrió al quinto día del cultivo con menores concentraciones de entre 0,02-0,03 g/L; dicha curva fue congruente con lo reportado en las diferentes literaturas citadas.

La doble tendencia de la cinética de crecimiento presentada pudo deberse a la adaptación de *Chlorella sp.* a las diferentes concentraciones de activador y AP, o bien, al diferente inóculo iniciador preparado para los dos grupos. Hecho que se evidencia, por ejemplo, al situarse en las tablas 8-2 y 17-3, el ensayo RK8 contenía el menor volumen de AP y su concentración celular al día 5 fue de 0,258 g/L y, 0,29 g/L al día 11; contrariamente, el ensayo RK9 contenía el mayor volumen de AP y le correspondió un valor de 0,278 g/L de concentración celular al día 5 y, 0,28 g/L al día 11. De los resultados presentados se observa que entre ensayos no hay una variación significativa al comparar los tratamientos RK₀ con los RK y RKR.

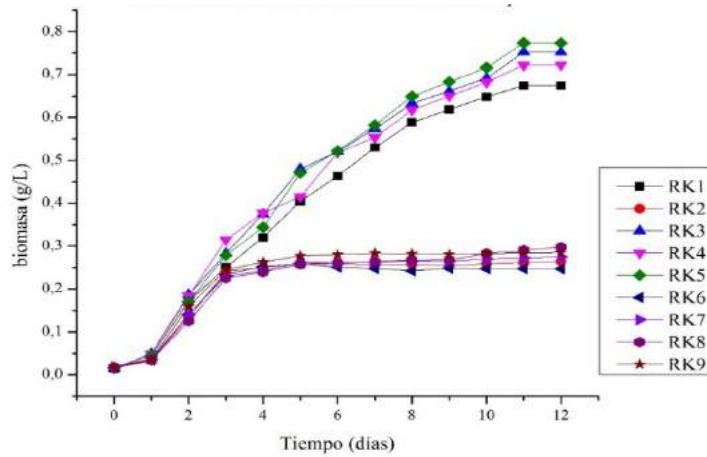


Gráfico 5-3: Cinética de crecimiento celular de *Chlorella sp.* de los ensayos RK.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

3.1.3. Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación

Tabla 18-3: Tasa de crecimiento máxima y tiempo de duplicación microalgal.

Tiempo	RK1	RK2	RK3	RK4	RK5	RK6	RK7	RK8	RK9	
2	$u_{m\acute{a}x}$	1,323	1,339	1,328	1,329	1,330	1,442	1,368	1,310	1,463
	t_d	0,524	0,518	0,522	0,522	0,521	0,481	0,507	0,529	0,474
		$\pm 0,031$	$\pm 0,038$	$\pm 0,089$	$\pm 0,086$	$\pm 0,080$	$\pm 0,066$	$\pm 0,043$	$\pm 0,151$	$\pm 0,033$
		$\pm 0,012$	$\pm 0,015$	$\pm 0,035$	$\pm 0,034$	$\pm 0,032$	$\pm 0,022$	$\pm 0,016$	$\pm 0,061$	$\pm 0,011$

$u_{m\acute{a}x}$: máxima tasa de crecimiento celular ($\text{d\acute{a}a}^{-1}$) t_d : tiempo de duplicación (días) t: tiempo (días)

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

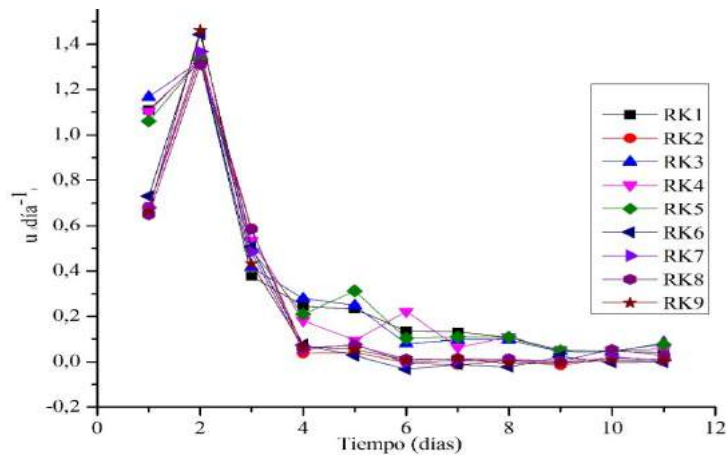


Gráfico 6-3: Tasa de crecimiento celular de *Chlorella sp.* para los ensayos RK.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

En la tabla 18-3, se aprecia que los ensayos RK1-RK9 registraron tasas de crecimiento máximas ($u_{m\acute{a}x}$) al cabo de 2 días de cultivo similares entre sí; el menor valor correspondió al ensayo RK8 con $1,310 \text{ d\acute{a}a}^{-1}$ y el mayor al RK9 con $1,463 \text{ d\acute{a}a}^{-1}$ y, sus tiempos de duplicación (t_d) fueron de 0,529 y 0,474 días, respectivamente.

De forma análoga, en el gráfico 6-3 los decrecimientos observados en las curvas pudieron deberse a la atenuación de los nutrientes en el medio de cultivo lo que afectó a la replicación celular diaria. En contraste con la literatura, (Vieira et al., 2002, pp. 1-5) reportó una $u_{\text{máx}}$ de $0,182 \text{ día}^{-1}$ y un t_d de 3,80 días, para el cultivo de *Spirulina platensis*. Por su parte (Tarhan et al., 2020, pp. 1-7), determinó valores de 7,22 días y 5,33 días como t_d para *Chlorella minutissima* crecida en las fases acuosas HTC de orujos de naranja y aceituna, correspondientemente. En este contexto, en el presente estudio se obtuvieron mayores tasas de crecimiento y menores tiempos de duplicación comprobando la influencia positiva del activador.

3.1.4. Productividad de biomasa microalgal

Tabla 19-3: Productividad experimental.

#Ensayo	Activador (g/L)	AP (% v/v)	Productividad de biomasa microalgal (g/Ldía)			
			RK	RKR	RK ₀	\bar{x}
1	0,3	0,9	0,096	0,065	0,071	0,081±0,022
2	0,5	0,9	0,052	0,061	0,028	0,056±0,006
3	0,3	2,6	0,084	0,090	0,058	0,087±0,004
4	0,5	2,6	0,089	0,079	0,053	0,084±0,008
5	0,2	1,75	0,097	0,082	0,068	0,090±0,010
6	0,6	1,75	0,053	0,056	0,028	0,055±0,000
7	0,4	1,75	0,057	0,056	0,031	0,057±0,000
8	0,4	0,5	0,053	0,059	0,027	0,056±0,005
9	0,4	3,0	0,063	0,057	0,030	0,060±0,005

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

La productividad promedio máxima de los tratamientos obtenida al final de la fase exponencial se describe en la tabla 19-3. El ensayo RK5 alcanzó la más alta productividad de $0,090 \text{ g/L día}$, concentración celular de $0,582 \text{ g/L}$, $u_{\text{máx}}$ de $1,330 \text{ día}^{-1}$ y t_d de $0,521 \text{ días}$, al séptimo día de cultivo y en un medio provisto con la menor concentración de activador ($0,2 \text{ g/L}$) e intermedia de AP ($1,75 \text{ \% v/v}$); por lo que se lo señaló como óptimo experimental. Los resultados de productividad presentados muestran una variación significativa al comparar los tratamientos RK₀ con los RK y RKR dado que el control de cinética celular únicamente se realizó a los días cero y once, por lo que no hubo modificaciones en los volúmenes del medio ni mayor ingreso de nutrientes provenientes de la AP. Complementariamente, la productividad pudo ser afectada por cómo fue cultivada inicialmente la cepa *Chlorella sp.* Puesto que, el inóculo empleado para los ensayos RK1-RK5 creció en un medio enriquecido de CO₂ al 18%; por el contrario, el inóculo empleado para los ensayos RK6-RK9 (que incluyó al RK2), con flujo continuo de aireación. Algo similar ocurrió en el estudio realizado por (Lv et al., 2010, pp. 4-5) donde microalgas pretratadas con $1,0 \text{ \%}$ de CO₂ aumentaron su tolerancia a diferentes concentraciones del gas, esto no ocurrió con aquellas a las que se inyectó aire condensado.

De igual forma ocurrió para *Nannochloropsis oculata* que no pudo crecer inicialmente por debajo del 5% de CO₂ o más, pero al ser pretratada con un 2 % de CO₂, se dedujo que las células lograrían crecer a concentraciones más altas, de hasta el 15% (Chiu et al., 2009, pp. 3-4). Finalmente, en (Tarhan et al., 2020, pp. 1-7) se obtuvo una productividad de 0,05 g/Ldía utilizando aguas de proceso HTC (200 °C) con *Chlorella minutissima*, y 0,06 g/Ldía en un cultivo convencional BG-11. Por otro lado, en (Du et al., 2012, pp. 1-4) se registró una productividad para *Chlorella vulgaris* de 0,1 g/Ldía utilizando una fase acuosa HTC (200 °C), que resulto mayor respecto al cultivo en medio BG-11 (0,01 g/Ldía). Así mismo, en (Belete et al., 2019, pp. 1-8) con una fase acuosa HTC (210 °C) de lodos activados se reportó una productividad de 0,2 g/Ldía y de 0,17 g/Ldía en medio BG-11. Bajo este contexto, las productividades en el presente estudio resultaron ser similares a la literatura, por lo que, la utilización de la fase acuosa HTC podría ser prometedora respecto al cultivo tradicional en BG-11, dependiendo de los nutrientes que éste contenga y de la adaptabilidad de la microalga a las condiciones de cultivo

3.1.5. Análisis estadístico

- **Base de datos ingresados al software estadístico**

Tabla 20-3: Base de datos ingresados al software estadístico.

Bloque	Activador g/L	AP %v/v	Productividad g/Ldía
T1	0,3	0,9	0,08
T2	0,5	0,9	0,06
T3	0,3	2,6	0,09
T4	0,5	2,6	0,08
T5	0,2	1,75	0,09
T6	0,6	1,75	0,05
T7	0,4	1,75	0,06
T8	0,4	0,5	0,06
T9	0,4	3,0	0,06
T10	0,4	3,0	0,06

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

La tabla 20-3 muestra el diseño del compuesto central: 2²+est el cual estudió los efectos de 2 factores experimentales en 10 corridas, incluyendo 2 puntos centrales por bloque, con 1 respuesta y 4 grados de libertad para el error. El diseño se ejecutó en un solo bloque y sin aleatorizar.

Los valores medios de las productividades experimentales fueron incluidos como la respuesta. Finalmente, los atributos bajo y alto considerados para el activador y la AP fueron 0,3-0,5 g/L, 0,9-2,6 %v/v respectivamente.

- **Gráfico de probabilidad normal de efectos**

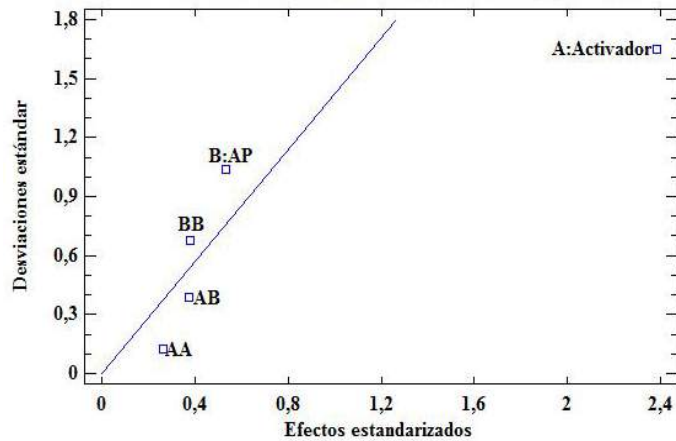


Gráfico 7-3: Gráfica de probabilidad normal de efectos.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

El gráfico 7-3 muestra los efectos estandarizados ordenados de menor a mayor y graficados contra la desviación estándar, para diferenciar los efectos significativos de aquellos que son manifestaciones justas del ruido (Statgraphics Centurion, 2006, pp. 25-26).

Es así como, el factor activador (A) tiene efecto significativo, a diferencia del factor fase acuosa (B: AP). A su vez, el cuadrado del activador (AA) y la interacción activador-fase acuosa (AB) tienen la ventaja de caer a la derecha de la línea del ruido por lo que pueden considerarse como significativos de acuerdo con la literatura (Sánchez, Torres y Esquivel, 2019, pp. 6-8).

- **Gráfica de interacción**

El gráfico de interacción 8-3 se ha propuesto para el par de factores estudiados, se observa una ligera interacción puesto que las líneas no son paralelas e incluso se cruzan en el extremo final superior; esto puede interpretarse como una matización respecto a los efectos simples (Statgraphics Centurion, 2006, pp. 31-32).

En otras palabras, se muestra que la AP presenta un efecto suave en el nivel más alto del activador (0,5); por el contrario, un efecto pesado en el nivel más bajo del activador (0,3) donde hay una mejora en la productividad.

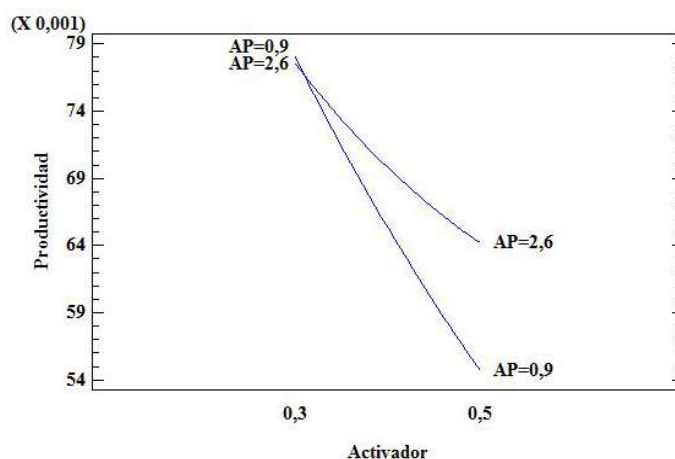


Gráfico 8-3: Gráfico de interacción para los factores experimentales.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

- Análisis de Varianza o ANOVA**

Tabla 21-3: Análisis de varianza para la productividad.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Activador	0,00101	1	0,00101	5,69	0,076
B:AP	0,00005	1	0,00005	0,28	0,624
AA	0,00001	1	0,00001	0,07	0,805
AB	0,00003	1	0,00003	0,14	0,726
BB	0,00003	1	0,00003	0,15	0,722
Error total	0,00071	4	0,00018		
Total (corr.)	0,00189	9			

R-cuadrada $R^2 = 62,5 \%$

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

La tabla 21-3 del análisis ANOVA, particiona la varianza de la productividad para cada uno de los efectos, sean estos principal, interacción y/o error experimental (Statgraphics Centurion, 2006, pp. 22-29). En este caso, cero efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que aparentemente los efectos de los factores no son significativos sobre la productividad microalgal al 95% de confianza. Resultados similares reportó (Vieira et al., 2002, pp. 1-5) al determinar que la interacción entre los parámetros urea y bicarbonato de sodio sobre la concentración de biomasa celular a través del MSR, no fue significativa, por lo que no ejercían influencia en la tasa de crecimiento de *Spirulina platensis*. Por otro lado, el estadístico R^2 indica que el modelo así ajustado, explica el 62,5 % de la variabilidad del modelo estimado sobre los datos observados en la productividad; motivo por el cual, en el presente estudio se realizó un ajuste para verificar las significancias (véase tabla 22-3).

- **Opciones de análisis**

Tabla 22-3: Análisis ANOVA para la productividad de biomasa microalgal.

Fuente	Suma Cuadrados	de	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Activador	0,00101		1	0,00101	8,26	0,023
B:AP	0,00003		1	0,00003	0,22	0,650
Error total	0,00085		7	0,00012		
Total (corr.)	0,00189		9			
R-cuadrada $R^2 = 54,8\%$						

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

Con base al principio de parsimonia o K.I.S.S (del inglés Keep It Simple Statistically/ subsistencia del más simple estadístico), los efectos insignificantes de interacción u otros efectos de segundo orden pueden ser removidos del análisis (Statgraphics Centurion, 2006, pp. 22-29). Por lo que, en correspondencia de los resultados del gráfico 8-3 de probabilidad normal y la tabla ANOVA 21-3; la tabla 22-3 muestra el análisis de la varianza sin incluir la prueba de falta de ajuste para los factores estudiados. En este sentido, el efecto activador (A) presenta un valor-P menor que 0,05, indicando que es significativo con un nivel de confianza del 95,0%, es decir, influye sobre la variable respuesta.

Por otro lado, el estadístico R^2 indica que el modelo así ajustado explica el 54,8% de la variabilidad en la productividad. Al percibir influencia, el modelo lineal parecería ser adecuado para los datos observados en los puntos experimentales seleccionados. Sin embargo, para disminuir la variabilidad de los datos y ajustar con mayor precisión el modelo se requeriría experimentar con rangos más amplios de operabilidad.

- **Diagrama de Pareto estandarizado**

El gráfico de Pareto estandarizado 9-3 para el nuevo modelo, muestra que el factor activador (A), al extenderse más allá de la línea alfa es estadísticamente significativo a un nivel de significancia del 5%. Por otro lado, evidentemente se abstiene de la lista la AP y cualquier efecto que implique este factor, así como sus interacciones correspondientes.

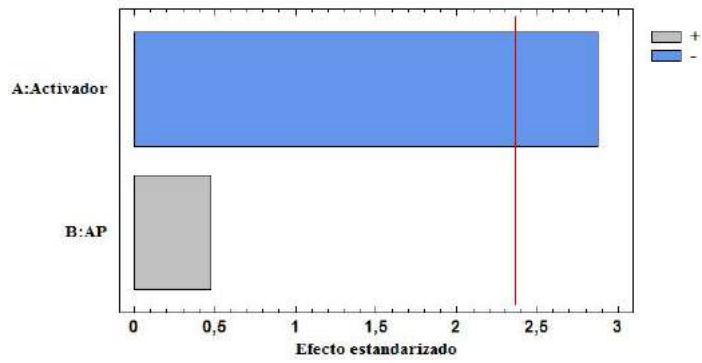


Gráfico 9-3: Diagrama de Pareto estandarizado.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

- Superficie de respuesta

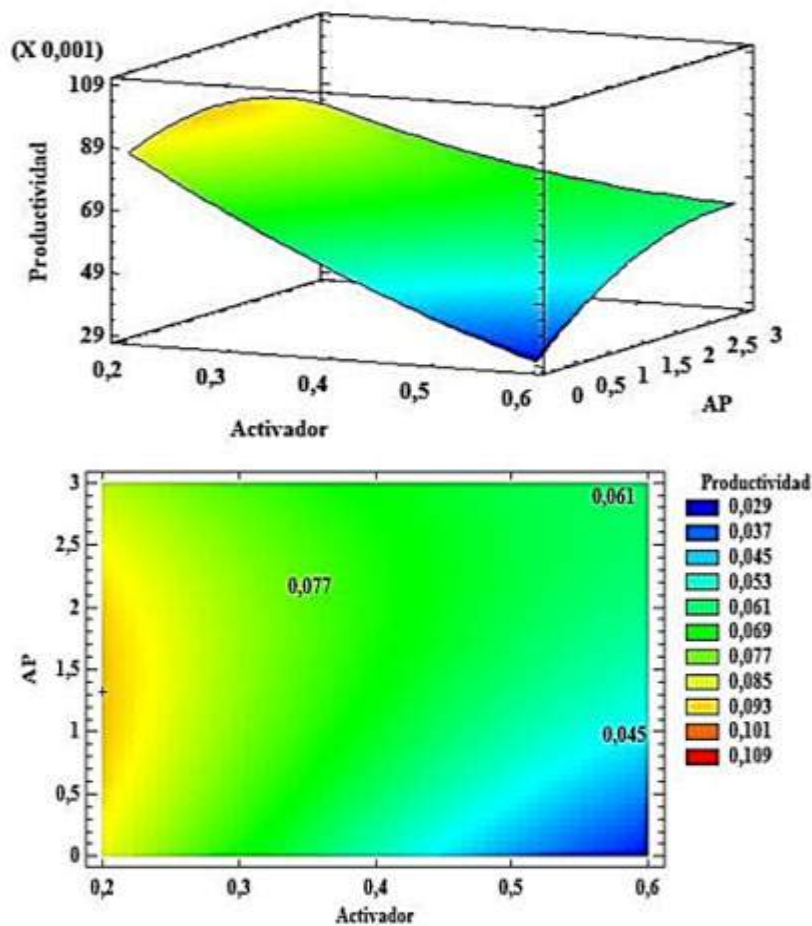


Gráfico 10-3: Superficie de respuesta estimada de la productividad microalgal.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

En el gráfico 10-3 se indica la región sobre la cual se llevó a cabo la optimización de la respuesta productividad de biomasa (eje z) predicha en función de los factores experimentales activador (eje x) y fase acuosa (eje y).

La región de color azul muestra la menor productividad de 0,029 g/Ldía, a partir de este a medida que despliega la escala de color aumenta el valor de la misma, siendo las zonas de tonalidad verde, amarillo y rojo de mayor interés por los altos valores en la productividad de 0,061 g/Ldía, 0,093 g/Ldía y 0,109 g/Ldía, respectivamente. Para este caso, el efecto de los factores estudiados, activador (X_1) y fase acuosa (X_2), sobre la productividad de biomasa microalgal durante 264 h de cultivo, arrojaron mejores resultados en concentraciones bajas o diluidas de AP y mínimas de activador.

Similar a (Vieira et al., 2002, pp. 1-5), los parámetros estudiados de urea (X_1) y bicarbonato (X_2) para el cultivo de *Spirulina platensis*, mostraron una disminución en la concentración de biomasa celular cuando se modificó la adición de los niveles pasando de bajos a altos.

La ecuación de regresión ajustada a los datos presentados fue:

$$\text{Productividad} = 0,128228 - 0,227258[\text{Activador}] + 0,00399375[\text{AP}] + 0,105151[\text{Activador}]^2 + 0,0294118[\text{Activador}][\text{AP}] - 0,00374793[\text{AP}]^2 \quad [12-3]$$

Donde, los valores de las variables están especificados en sus unidades originales: activador (g/L), fase acuosa (%v/v) y productividad de biomasa (g/Ldía).

- **Optimización de la respuesta**

Tabla 23-3: Optimización de la AP y activador para la productividad de biomasa microalgal.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo	Productividad optimizada
Activador (g/L)	0,2	0,6	0,2	0,093 g/Ldía
AP (%v/v)	0,5	3,0	1,317	

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

La tabla 23-3 muestra la combinación óptima de los factores en los niveles que maximizan la productividad sobre la región indicada en el gráfico 10-3. Siendo estos valores para el activador y la AP de 0,2 g/L y 1,317% v/v respectivamente, con una productividad teórica de 0,093 g/Ldía. Esta optimización del diseño MSR se aproxima aparentemente al ensayo óptimo experimental RK5 en condiciones de 0,2 g/L de activador y 1,75 % v/v de fase acuosa, confirmándose que el método empleado es válido.

3.2. Resultados de la caracterización del pergamino de café

Tabla 24-3: Caracterización del pergamino de café sin y con tratamiento de carbonización hidrotermal.

Pergamino de café			
		Biomasa	Biomasa
a) Análisis elemental		sin HTC	con HTC
C	(%)	46,10 ±0,3	46,90 ± 0,0
H	(%)	6,20 ±0,5	5,80 ±0,3
N	(%)	0,90 ±0,1	0,60 ±0,0
S	(%)	n.d.	n.d.
b) Análisis estructural			
Lignina	(%)	87,533 ±0,031	88,649 ±0,199
Hemicelulosa	(%)	9,217 ±0,041	7,9987 ±0,303
Celulosa	(%)	3,150 ± 0,057	3,2526 ±0,115
Sílice	(%)	0,099 ±0,000	0,0996 ±0,000
c) Análisis proximal			
Cenizas	(%)	0,165 ± 0,001	0,078 ±0,015
Humedad	(%)	8,275 ± 0,23	9,018 ±0,34
n.d: no detectado			

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

La tabla 24-3 muestra los resultados de la caracterización elemental, estructural y proximal realizados al pergamino de café con y sin tratamiento de carbonización hidrotermal (HTC).

• Análisis elemental

La biomasa de pergamino de café sin HTC presentó una composición de 46,10 %C, 6,20 %H, 0,90 %N, y no se detectó S, similar a los valores reportados en (Alvarez, 2014, p. 89), de 48,9 %C, 6,1 %H, 0,74 %N, y 0,07 %S de la biomasa seca del endocarpio o pergamino de café. Un ligero aumento del contenido de C registró la biomasa de pergamino de café con HTC, es decir el hidrocarburo resultante a causa de las reacciones de descarboxilación y deshidratación durante el proceso (Tarhan et al., 2020, pp. 1-7), pasando de 46,10 a 46,90 %; caso contrario ocurrió con el H que disminuyó levemente de 6,20 a 5,80 %, y el N de 0,90 a 0,60 %. A pesar de los bajos resultados de N y S, en (Yousuf, 2019, pp. 1-9) se menciona que la experiencia ha sugerido que los medios de cultivo podrían ser flexibles y adaptables a condiciones ambientales específicas de acuerdo a las necesidades metabólicas de las microalgas.

• Análisis estructural

El contenido de lignina, celulosa, hemicelulosa y sílice se determinaron como 87,533; 3,150; 9,217 y 0,099 % respectivamente para el pergamino de café sin tratamiento HTC. Estos valores fueron de 88,649; 3,2526; 7,9987 y 0,0996 % para el pergamino de café con tratamiento HTC (véase tabla 23-3b).

En (Manals Cutiño, Salas Tort y Penedo Medina, 2018, pp. 1-11), se señala que el pergamino de café es fuente característica principalmente de pentosanos, celulosa, sílice, lignina y cenizas, entre otros compuestos en menor proporción. En este sentido, en (Tarhan et al., 2020, pp. 1-7) se explica que la degradación de la hemicelulosa (generalmente 9,99 % en biomasa) y derivados a 180 °C, dan lugar a que el pH de la fase sea ácida. Con lo que se explica el pH ácido de la AP de pergamino de café empleada para los tratamientos (véase tabla 24-3a).

- **Análisis proximal**

El contenido de cenizas de la biomasa sólida sin y con tratamiento HTC de pergamino de café fueron de 0,165 y 0,078 respectivamente (véase tabla 23-3c), esto indicó que gran parte de la materia inorgánica se dirigió a la AP durante el proceso, que se utilizó como nutrientes para las microalgas. Respecto a la humedad, para las biomásas sólidas sin HTC se registró 8,275% y 9,018% con tratamiento HTC; esto mostró que, después del tratamiento los residuos de pergamino de café absorbieron la humedad del medio en su estructura.

3.3. Resultados de la caracterización de la fase acuosa HTC del pergamino de café

La tabla 25-3 muestra los resultados de las caracterizaciones realizadas a la fase acuosa HTC preparada a partir del pergamino de café.

Tabla 25-3: Caracterización de la fase acuosa del pergamino de café.

Caracterización fase acuosa HTC de pergamino de café					
a) Análisis					
pH		4,7± 0,00	Conductividad (µS/cm)		459± 0,00
b) Análisis bioquímico					
DQO	(mg/L O ₂)	4553,3 ± 41,63	DBO	(mg/L O ₂)	1300 ± 11,5
c) Análisis cromatográfico					
Ácidos orgánicos			Carbohidratos		
Ácido acético	(mg/L)	n.d.	Glucosa	(mg/L)	n.d.
Ácido láctico	(mg/L)	66,224±0,001	Xilosa	(mg/L)	219,637±0,008
			Celobiosa	(mg/L)	n.d.
d) Análisis composicional					
Macronutrientes					
TNK	(mg/L)	n.d.	PT	(mg/L)	15,2 ± 0,06
Micronutrientes traza					
Ca	(mg/L)	5,92±0,03	K	(mg/L)	76,52±0,67
Cu	(mg/L)	n.d.	Fe	(mg/L)	n.d.
Mg	(mg/L)	3,61±0,04	Na	(mg/L)	3,69±8,53
Zn	(mg/L)	n.d.			
n.d: no detectado					

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

- **Conductividad y pH**

El pH y la conductividad de la fase acuosa HTC de pergamino de café correspondieron a 4,72 y 459 $\mu\text{S}/\text{cm}$ respectivamente (tabla 24-3a), siendo un pH ácido que puede explicarse en primer lugar por la liberación de ácidos orgánicos (ácido láctico, acético, etc.); en segundo lugar, a la mínima cantidad de proteínas provenientes de la fase acuosa. La conductividad alcanzada fue baja respecto a la literatura encontrada. Por ejemplo en (Tarhan et al., 2021, pp. 1-9), el pH de la fase acuosa HTC (200 °C) del orujo de naranja y aceituna fue de 4,2 y 4,5 y la conductividad de 3700 y 6900 $\mu\text{S}/\text{cm}$ respectivamente. Sin embargo, esto no resultó influyente en el crecimiento de las microalgas debido a que la mayoría de las sales metálicas pudieron ser absorbidos por el material pretratado, es decir, por el pergamino de café durante el tratamiento HTC.

- **Demanda química y biológica de oxígeno**

La demanda química (DQO) y biológica (DBO) de oxígeno fue de 4553,3 y 1300 mg/L O_2 correspondientemente (véase tabla 24-3b). Con ello, el índice de biodegradabilidad calculado de la relación de DBO/DQO fue de 0,28 que al ser menor a 0,5, se infiere que la AP es de baja biodegradabilidad para la parte microbiológica, siendo indicativo de la presencia de materia inorgánica. Por otro lado, la relación DQO/DBO fue de 3,5, infiriéndose en que se trabajó con una AP químicamente biodegradable.

- **Ácidos orgánicos y carbohidratos**

La cantidad nula o no detectada de algunos carbohidratos analizados como glucosa y celobiosa (a excepción de xilosa 219,6 ppm) en la AP puede explicar el bajo DBO obtenido, al igual que la escasa presencia de ácido láctico (66,22 ppm) y nula de ácido acético (véase tabla 24-3c). Según (Tarhan et al., 2020, pp. 1-7) estos ácidos orgánicos y otros como el fórmico, son muy comunes en las aguas de proceso HTC como resultado de la descomposición de proteínas y carbohidratos. Además, se reportaron valores altos de 1823 ppm para el ácido láctico y 1646,5 ppm para el ácido acético en la AP del orujo de naranja en comparación con este estudio. Sin embargo, el acetato de sodio, la xilosa y el ácido láctico sirvieron como fuente de C adicional que impulsaron el crecimiento de *Chlorella sp.*

- **Nitrógeno Kjeldahl total (TNK)**

Según (Yao et al., 2016, pp. 1-9), la disponibilidad de nitrógeno (N) en la fase acuosa depende del contenido de éste en la biomasa utilizada, al igual que las condiciones hidrotermales; a mayor contenido de N en la biomasa inicial y mayor temperatura hidrotermal, generan una mayor recuperación de este por la hidrólisis, descarboxilación y deshidratación de componentes como proteínas, lípidos y carbohidratos en la biomasa (Tarhan et al., 2020, pp. 1-2). Siendo así que, una nula recuperación del nitrógeno en la AP fueron producto de un menor contenido de nitrógeno en la biomasa del pergamino de café que se evidenció en el análisis elemental (tabla 23-3) y de una temperatura hidrotermal ligeramente menor (180 °C) en relación con otros estudios.

Investigaciones pioneras como en (Poddar, Sen y Martin, 2018, pp. 298-309); (Farias y Sforza, 2016, pp. 1-7) y (Du et al., 2012, pp. 354-357) señalaron que el amonio es la principal fuente de nitrógeno asimilado por las microalgas, dado que requieren de mayor gasto energético a nivel celular para aprovechar el N en forma de aminoácidos, purinas o urea. Este hecho es atribuido a que las microalgas no crecen correctamente en la AP convencional a menos que se realicen diluciones adecuadas (Yao et al., 2016, pp. 1-9). Al no detectarse NTK, el metabolismo de *Chlorella sp.* conduciría a una mayor acumulación de lípidos y en especial, a carbohidratos en vez de proteínas (Farias y Sforza, 2016, pp. 1-3).

- **Fósforo total (PT)**

El contenido de fósforo (PT) en la fase acuosa HTC (véase tabla 24-3) fue de 15,20 mg/L. En comparación con (Du et al., 2012, pp. 1-4), se obtuvo un valor bajo de PT procedente de la AP que se explicaría por las condiciones suaves del proceso hidrotermal; por ende, el fósforo incorporado como fosfatos o fosfatos ácidos del fertilizante comercial (véase tabla 6-2) suplementaron los requerimientos del fósforo en las microalgas.

- **Micronutrientes traza**

La AP del proceso HTC presentó valores de nutrientes secundarios Ca 5,92 mg/L, Mg 3,61 mg/L, micronutrientes K 76,52 mg/L, Na 3,69 mg/L, y resultados no detectados para el Cu, Fe, Zn (véase tabla 24-3). En el medio de crecimiento microalgal estas concentraciones no alcanzarían los nutrientes requeridos en comparación con los medios de crecimiento sintéticos (Belete et al., 2019, pp. 1-8). Sin embargo, su suplementación inicial durante la preparación del inóculo en el que se empleó el fertilizante NPK comercial con composición detallada en la tabla 6-2, junto a los nutrientes que aportaron tanto la AP como el activador permitieron el crecimiento de *Chlorella sp.* Pues estos micronutrientes traza, son indispensables porque cumplen con funciones específicas como el Ca que mantiene la estructura celular; el Mg que forma parte de la clorofila; el Na y K que actúan activando enzimas; Fe que ayuda a la asimilación de N, y el Zn que actúa como coenzima (Abalde et al., 1995, pp. 51-55).

En contraste con la literatura, en (Belete et al., 2019, pp. 1-8) la fase acuosa de HTC-210 de lodos activados presentó Ca 299,7, Mg 6,1, B 18,2, Cu 1,7, Fe 23,8, Mn 0,05, Na 1084, Zn 2,1 como nutrientes secundarios y micronutrientes, respectivamente. Por otro lado, la tabla 2-1 muestra los valores resultantes de la caracterización de la fase acuosa realizada por (Du et al., 2012, pp. 354-357) para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

3.4. Resultados del análisis FT-IR de la biomasa microalgal de la etapa I

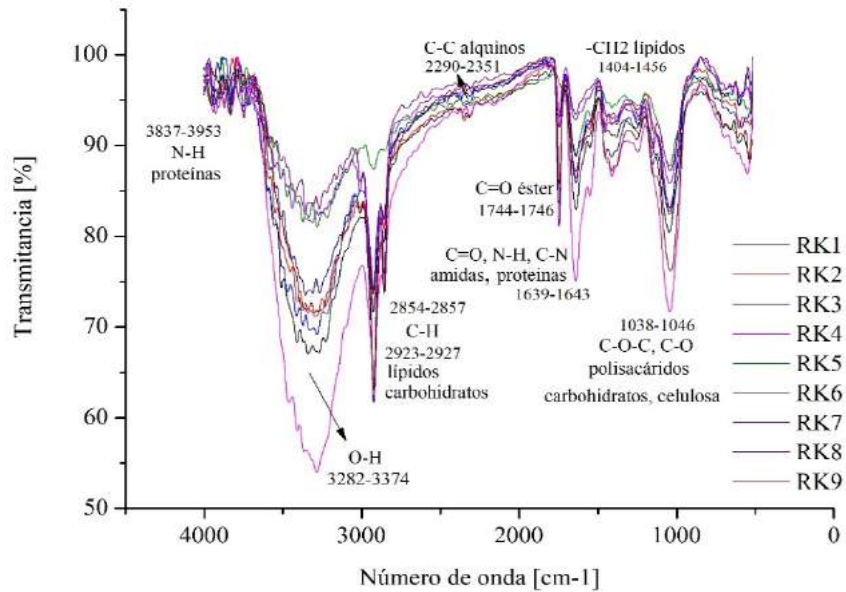


Gráfico 11-3: Espectros FT-IR de *Chlorella sp.* cultivada en los ensayos RK.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

Tabla 26-3: Picos principales del análisis FT-IR de *Chlorella sp.*

Rango de picos de <i>Chlorella sp.</i> , ensayos RK (cm ⁻¹)	Banda típica y asignación de la literatura	Rango de número de onda (cm ⁻¹)
3374-3282	O-H estiramiento, agua/alcohol	3029-3639
2923-2850	C-N estiramiento, nitrilos	2250-2220
2290-2351	C-C estiramiento, alquinos	2100-2260
1744-1746	v C=O estiramiento, celulosa	1583-1709
1639-1643	-CH2 estiramiento, lípidos	1357-1423
1546-1643	>P=O estiramiento, ácidos nucleicos	1191-1356
1404, 1456	C=O estiramiento, amidas	1600-1670
1038-1046	C-O-C carbohidratos / polisacáridos	980- 1072
1238	C-N estiramiento, aminas	1020-1250

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

En el gráfico 11-3 y la tabla 25-3, de acuerdo con la literatura citada, la asignación de los picos principales obtenidos a 3374,82 y 3282,25 cm⁻¹ correspondieron al estiramiento del grupo O-H por la humedad o la vez la presencia de un grupo alcohol (carbohidratos, incluido celulosa) en la muestra.

Las bandas a 2923,56 y 2850,27 cm^{-1} correspondieron al estiramiento C-H del grupo CH_2 en los alcanos además que indicaron una insaturación que formaría parte de las cadenas lipídicas de la microalga.

Según (Tejeda et al., 2015, pp. 1-10), *Chlorella sp.* es rica en ácidos linolénico y oleico. Las bandas obtenidas entre 2290-2351 cm^{-1} correspondieron al estiramiento de $\text{C} \equiv \text{C}$ en grupos alquinos; el pico a 1744-1746 cm^{-1} correspondió al estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ asociados a los grupos amida I y alrededor de 1639-1643 cm^{-1} a la vibración de flexión de N-H amidas II respectivamente en las proteínas; las bandas 1038-1046 cm^{-1} indicó el estiramiento de C-O y C-O-C presente en las estructuras cíclicas de los carbohidratos (incluido celulosa y hemicelulosa); el pico a 1546-1643 cm^{-1} también es asignada al estiramiento asimétrico del enlace O-C-O en la celulosa; los picos alrededor de 1238 cm^{-1} se asignó al estiramiento del enlace fosfodiéster $>\text{P}=\text{O}$ de ácidos nucleicos.

La literatura menciona que algunos análisis FT-IR realizadas en microalgas indican que la zona entre 800 y 1800 cm^{-1} es propia para proteínas y carbohidratos (Phukan et al., 2011, pp. 4-5). La zona entre 3200-3500 cm^{-1} indica la presencia de lípidos por las vibraciones simétricas y asimétricas del grupo CH_2 metílicos y si la banda se resalta entre 2929-2850 cm^{-1} corresponde a los grupos CH_2 metilenos; en la región 1154-1720 cm^{-1} se asignan al $\text{C}=\text{O}$ del grupo éster indicativo para triglicéridos y ácidos grasos respectivamente, también puede atribuirse a la presencia de celulosa u otros polisacáridos. Las bandas entre 1191-1356 cm^{-1} se derivan a los ácidos nucleicos y, por último, las bandas 2100-2260 cm^{-1} corresponden a los alquinos (Arif et al., 2021, pp. 18-19; Yatirajula et al., 2019, pp. 1-7).

3.5. Resultados de la Etapa II de la biofijación del CO_2

3.5.1. Cinética de crecimiento microalgal y cuantificación de la biomasa

En la tabla 27-3 se muestra la información detallada de las concentraciones celulares en función al tiempo, todos los ensayos iniciaron con una concentración alrededor de 0,015 g/L. Los tratamientos alcanzaron la fase exponencial indistintamente, tal es el caso, para los ensayos RL aire y RL1 al sexto día, y el ensayo RL2 al quinto día.

Tabla 27-3: Resultados de la concentración celular de los ensayos RL.

TIEMPO (días)	RL aire (0,04 %)	RL1 (5%)	RL2 (10%)	RL3 (30%)	RL4 (15%)
0	0,018 ±0,000	0,017 ±0,001	0,018 ±0,000	0,017 ±0,000	0,017 ±0,001
1	0,030 ±0,000	0,025 ±0,000	0,048 ±0,001	0,022 ±0,001	0,020 ±0,001
5	0,165 ±0,000	0,142 ±0,000	0,098 ±0,000	0,179 ±0,000	0,248 ±0,000
6	0,179 ±0,001	0,159 ±0,000	0,096 ±0,001	0,199 ±0,000	0,302 ±0,000
7	0,193 ±0,000	0,154 ±0,001	0,093 ±0,001	0,219 ±0,001	0,329 ±0,000
8	0,191 ±0,001	0,150 ±0,002	0,099 ±0,001	0,289 ±0,001	0,342 ±0,001
11	0,192 ±0,001	0,182 ±0,001	0,114 ±0,003	0,357 ±0,008	0,402 ±0,001
TIEMPO (días)	RL aire	RL1₀	RL2₀	RL3₀	RL4₀
0	0,018 ±0,000	0,017 ±0,000	0,018 ±0,000	0,018 ±0,000	0,018 ±0,001
11	0,192 ±0,001	0,262 ±0,001	0,122 ±0,001	0,332 ±0,003	0,429 ±0,001

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

Dada la tendencia exponencial en la concentración celular (véase gráfico 12-3) para los ensayos RL3 (30% CO₂) y RL4 (15% CO₂) que tuvieron un comportamiento semejante a los ensayos RK1-RK5 de la primera etapa, resultaron ser indicativos de una mayor concentración de la biomasa; el octavo día fue seleccionado como el final de la fase exponencial. La concentración celular de los ensayos normales, réplica y réplica-control indicaron que no difieren significativamente.

Asimismo, al cotejar estos valores con lo expuesto en la tabla 17-3, fueron parecidas al grupo RK6-RK9(RK2) con un rango entre 0,1-0,4 g/L. Las variaciones en las concentraciones de los tratamientos RK y RL se explicarían por el cambio en las condiciones experimentales; sin embargo, también pudieron ser producto de no trabajar con la concentración óptima del gas, ya que, la escasa solubilidad del CO₂ (cerca a 1,450 mg/L a 25°C y 1atm de presión) daría lugar a que éste sea liberado a la atmósfera antes de su disolución completa en el medio, e incluso puede atribuirse al ajuste en el pH (Bhola et al., 2016, pp. 401-412).

Por otro lado, la concentración de biomasa alcanzada para los ensayos RL aire a los 6 días de cultivo fue de 0,179 g/L y del ensayo RL1 de 0,159 g/L, mientras que del ensayo RL2 a los 5 días de cultivo fue de 0,012 g/L, y de los ensayos RL3 y RL4 a los 8 días de cultivo fueron de 0,289 g/L y 0,342 g/L, respectivamente; valores menores en contraste con (Meng y Kassim, 2017, pp. 1-7), pues reportaron una concentración celular para *Chlorella sp.* de 0,64 g/L al 5% de CO₂ (véase tabla 28-3).

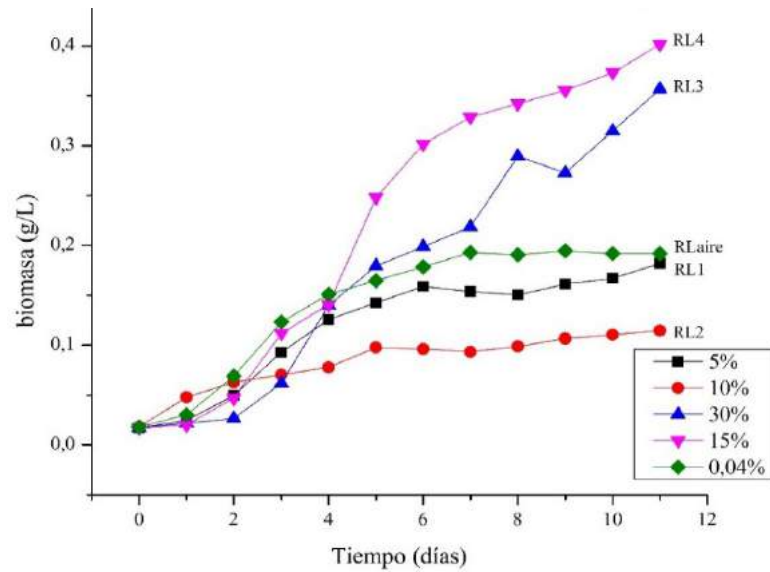


Gráfico 12-3: Cinética de crecimiento para *Chlorella sp.* de los ensayos RL.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

3.5.2. Parámetros cinéticos y composición elemental de *Chlorella sp.*

Tabla 28-3: Parámetros cinéticos y composición elemental de *Chlorella sp.*

Parámetro	Concentración de CO ₂ (% v/v)				
	RLaire (0,04)	RL1 (5)	RL2 (10)	RL3 (30)	RL4 (15)
u_{máx} (día ⁻¹)	0,826±0,000	0,693±0,018	0,975±0,004	0,845±0,010	0,872±0,068
t_g (día)	0,839±0,000	1,001±0,090	0,711±0,003	0,820±0,010	0,795±0,059
Productividad (mg/Ldía)	30,00±0,000	27,00±0,001	12,00±0,003	38,00±0,004	46,00±0,003
Análisis elemental					
% C	43,4±0,000	44,1±2,040	44,9±3,533	36,8±1,805	41,8±1,363
% H	6,24±0,000	6,30±1,209	6,7±1,381	5,50±0,817	6,00±0,720
% N	2,43±0,000	2,50±0,197	3,0±0,546	4,10±0,293	3,70±0,040
% S	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,000	0,00±0,00
Biofijación de CO₂ (mgL ⁻¹ día ⁻¹)	48,00±0,000	44,00±0,000	20,00±0,000	52,00±0,000	71,00±0,000

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

La tabla 28-3 y gráfico 13-3 muestran los resultados de la tasa de crecimiento, tiempo de duplicación, productividad de biomasa, análisis elemental y biofijación de CO₂ de los cultivos RL1-RL4 con concentraciones de 5,10,15 y 30 % v/v del mismo gas.

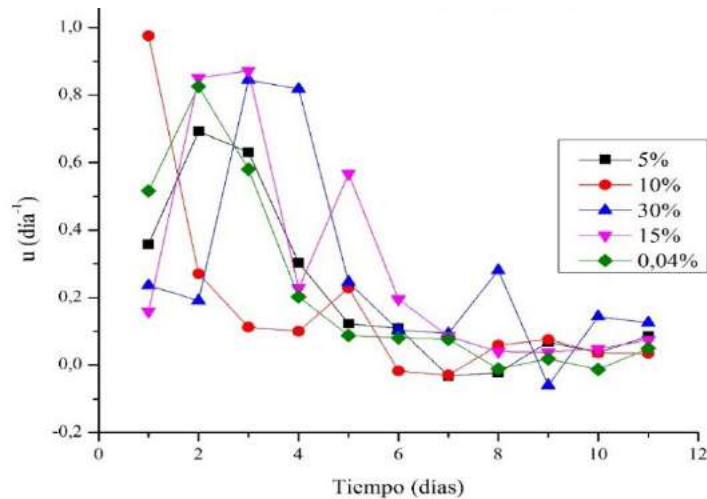


Gráfico 13-3: Tasa de crecimiento de *Chlorella sp.* para los ensayos RL.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

- **Parámetros cinéticos y productividad**

Para el ensayo RLaire provisto con 0,04% de CO₂, se obtuvo una productividad de biomasa de 30 mg/Ldía, una tasa de crecimiento máxima de 0,826 día⁻¹ y un tiempo de duplicación de 0,839 días; correspondientemente, para el ensayo RL1 al 5% de CO₂, de 27 mg/Ldía, 0,693 día⁻¹, 1,001 días; el ensayo RL2 al 10 % de CO₂, de 12 mg/Ldía, 0,975 día⁻¹, 0,711 días; el ensayo RL3 al 30 % de CO₂, de 38 mg/Ldía, 0,845día⁻¹, 0,820 días; finalmente, para el ensayo RL4 al 15% de CO₂, de 46 mg/Ldía, 0,872 día⁻¹, 0,795 días, siendo este último el ensayo de mayor productividad (véase tabla 28-3 y gráfico 13-3). Las productividades obtenidas, por un lado difieren de (Meng y Kassim, 2017, pp. 1-7), donde se reportó un valor de 56,22 mg/Ldía para *Chlorella sp.* al 15% de CO₂; además, dicho autor recalcó que esta especie presenta un amplio rango de tolerancia a las concentraciones del gas (<50 %), hecho que infiere en su adaptabilidad. Por otro lado, la productividad del ensayo RL4 se asemeja a la registrada para *T. suecica* de 49,21 mg/Ldía al 0,04% de CO₂ (véase tabla 29-3). En comparación a este estudio, las tasas de crecimiento para *Chlorella sp.* reportadas al 0,04-30 % de CO₂ en (Meng y Kassim, 2017, pp. 1-7) son menores, no obstante, al aplicarse entre 5-20 % de CO₂, resultan similares para *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella pyrenoidosa* (Tang et al., 2011, p. 4).

- **Análisis elemental**

El análisis elemental realizado a la biomasa seca de *Chlorella sp.*, no muestra diferencias significativas entre ensayos a excepción del RL3. El mayor contenido de C, H, N y S se obtuvo en el ensayo RL2 con valores de 44,9 %; 6,7 %; 3,0 % y 0 %, respectivamente; dados los resultados en tabla 28-3, se obtuvieron mayores contenidos de C e H y menor contenido de N; de este último elemento, su valor pudo ser producto del nulo contenido de N Kjeldahl en la fase acuosa HTC lo que, a la larga, puede afectar el contenido de proteínas en la biomasa microalgal.

En contraste con la literatura, (Yao et al., 2016, pp. 1-9) reportó 45,6 %C, 7,4 %N, 6,8 %H empleando aguas residuales del proceso HTC para *Arthrospira platensis*. De manera similar, (Du et al., 2012, pp. 354-357) utilizando nutrientes de fase acuosa HTC reportó valores de 42,9 %C, 6,1 %H, 9,7 %N para *Chlorella vulgaris*, Finalmente, el contenido alto de C puede contribuir a una mayor presencia de lípidos en la biomasa al conformarse por grandes cadenas de este elemento. Vale recalcar, que este tipo de propiedades son deseables cuando de combustibles se trata, puesto que un alto contenido lipídico y un bajo contenido de proteínas conducen a una mejor calidad del mismo (Du et al., 2012, pp. 354-357).

- **Biofijación**

Tabla 29-3: Valores de la biofijación de CO₂ en diferentes especies microalgales.

Especie	%CO ₂	Productividad mg/Ldía	Tasa de crecimiento (día ⁻¹)	Biofijación CO ₂ (mgL ⁻¹ día ⁻¹)	Referencia
<i>Chlorella sp.</i>	0,04	55,66	0,25	87,76	(Meng y Kassim, 2017, pp. 1-7)
	5	59,33	0,25	95,73	
	15	56,22	0,25	96,89	
	30	4,24	0,06	96,89	
<i>T. suecica</i>	0,04	49,21	0,26	75,78	(Meng y Kassim, 2017, pp. 1-7)
	5	65,96	0,29	111,26	
	15	67,61	0,29	104,12	
	30	3,2	0,06	4,81	
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0,03	-	0,23	570	(Kumar y Das, 2012, p. 5)
	5	-	0,25	1210	
	10	-	0,2	560	
	15	-	0,16	540	
	30	-	0,12	490	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,03	0.083	0,507	150	(Tang et al., 2011, p. 4)
	5	158	0,943	286	
	10	155	0,887	288	
	20	134	0,780	246	
	30	81	0,544	151	
	50	56	0,299	105	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,03	65	0,688	134	(Tang et al., 2011, p. 4)
	5	133	0,993	244	
	10	144	0,993	260	
	20	121	0,909	223	
	30	75	0,532	152	
	50	54	0,326	108	

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

Dados los resultados de biofijación, el ensayo RL2 al 10 % CO₂ registró un valor menor de 20 mgL⁻¹día⁻¹ y el mayor valor correspondió al ensayo RL4 al 15 % CO₂ de 71 mgL⁻¹día⁻¹. Los resultados del presente estudio, se pueden comparar con hallazgos de la amplia literatura como se muestra en la tabla 29-3, donde la biofijación del ensayo RL4 fue similar a lo obtenido en (Meng y Kassim, 2017, pp. 1-7) de 75,78 mgL⁻¹día⁻¹ para *T. suecica* y ligeramente menor para *Chlorella sp* de 87,76 mgL⁻¹día⁻¹.

3.5.3. Análisis estadístico de la biofijación de CO₂ en las microalgas

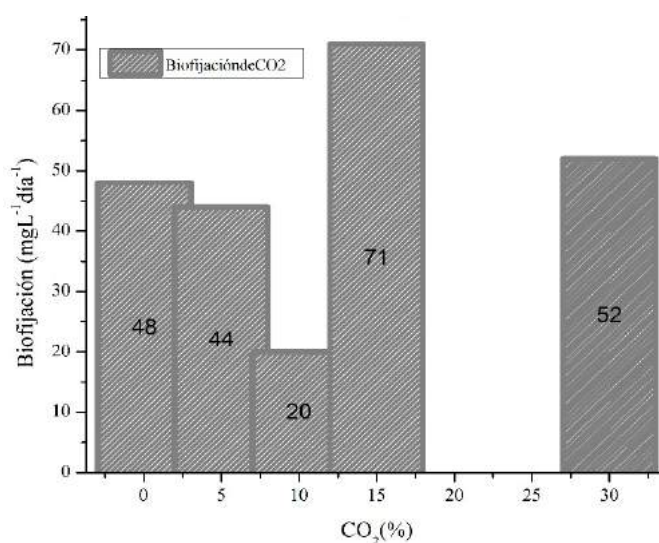


Gráfico 14-3: Correlación de la biofijación de carbono en *Chlorella sp.*

Realizado por: Andrade, M; Bayas, D, 2022.

El gráfico 14-3 muestra los valores de CO₂ biofijado de acuerdo con el suministro de gas inyectado a los diferentes cultivos de *Chlorella sp.* Siendo el ensayo RL4 de mayor interés por la alta biofijación de 71 mgL⁻¹día⁻¹ al 15 %CO₂ y en condiciones de medio optimizadas; este porcentaje de CO₂ se destaca en (Meng y Kassim, 2017, pp. 1-7), puesto que proporcionaría un adecuado ambiente para *Chlorella sp.*, gracias a que no requiere la suplementación de productos químicos adicionales para regular el pH del medio.

En este contexto, el valor del pH medido a los 11 días de cultivo aumentó considerablemente, volviéndolo ligeramente básico en un rango entre 7,5-8,5, debido principalmente a la absorción de CO₂, al incremento de carbonato y bicarbonato, hidróxido (OH) y la reducción del CO₂ durante la fotosíntesis, influyendo favorablemente en la adaptabilidad de las microalgas al medio expuesto (Meng y Kassim, 2017, pp. 1-7), siendo el valor óptimo de crecimiento de 8,5 lo que explicaría la variabilidad presentada entre los diferentes porcentajes de CO₂.

3.5.4. Resultados del análisis FT-IR de la biomasa microalgal de la etapa II

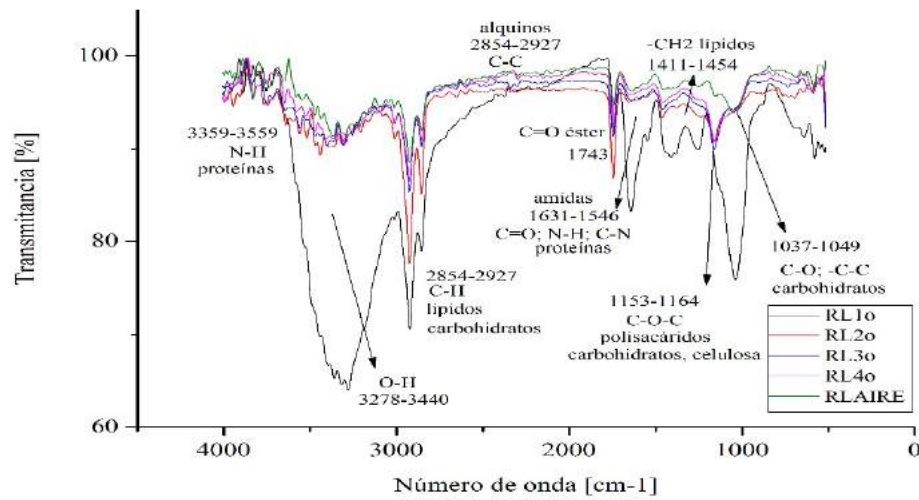


Gráfico 15-3: Espectros FT-IR de *Chlorella sp.* cultivadas en los ensayos RL.

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

El gráfico 15-3 indica el espectro FT-IR de las muestras en base seca de *Chlorella sp.* cultivadas a diferentes concentraciones de CO₂ (5, 10, 15 y 30 % v/v). Los picos principales fueron entre 3278-3440 cm⁻¹ designadas al O-H como parte de la humedad en la muestra o bien, de los polisacáridos presentes (carbohidratos, celulosa); las bandas entre 2854-2927 cm⁻¹ de las vibraciones simétricas y asimétricas de C-H del grupo CH₂ y CH₃ de las cadenas lipídicas y carbohidratos; entre 2854-2927 cm⁻¹ designadas a C ≡ C que indicaron la presencia de alquinos; en 1743 cm⁻¹ al estiramiento del enlace C = O parte de los lípidos; entre 1631-1546 cm⁻¹ que correspondieron a las vibraciones de estiramiento y bandeo de C = O, N-H y C – N que pertenecieron a las proteínas (amidas, aminas, etc.) en las microalgas; la zona entre 1411-1454 cm⁻¹ a las vibraciones de tijeo de los enlaces C – H en los lípidos; la banda entre 1153-1164 cm⁻¹ del estiramiento/balanceo de C-O-C parte de los carbohidratos o polisacáridos (celulosa, azúcares, almidón) inclusive pudo atribuirse a la presencia de ésteres de ácidos grasos: ácido saturados 15-74 %, monoinsaturados 12-52 %, poliinsaturados 5-49 % (Lopez, 2017, pp. 42-48); y entre 1037-1049 cm⁻¹ que se asignaron a la vibración de C – O (estiramiento), –C – C, C – H (balanceo) de los carbohidratos (Mondragón, 2015, pp. 78-192). Finalmente, el análisis de espectrofotometría infrarroja del ensayo RLaire (representante de ensayos RK), en comparación con los demás ensayos RL, alcanzó mayores transmitancias, siendo indicativo de una menor concentración de compuestos en la muestra. De hecho, dado los resultados del análisis elemental de *Chlorella sp.* cultivadas en este estudio (véase tabla 28-3), se observa una correlación mayoritaria en la composición de carbono e hidrógeno que representarían a los carbohidratos y lípidos de la biomasa microalgal y una menor concentración de compuestos nitrogenados o proteínas que se evidencian en los gráficos 11-3 y 15-3.

CONCLUSIONES

- Se evaluó la influencia de la fase acuosa de la carbonización hidrotermal del pergamino de café y del activador como nutrientes en la productividad y la biofijación de CO₂ en *Chlorella sp.*, arrojando el mejor nivel de productividad experimental el ensayo RK5 con 0,2 g/L de activador y 1,75 %v/v de AP dando lugar a una productividad de 0,09 g/Ldía, con tasa de crecimiento máxima de 1,330 día⁻¹ y tiempo de duplicación de 0,521 días.
- Se definieron las condiciones óptimas de la concentración de fase acuosa HTC del pergamino de café y del activador de crecimiento mediante el método de superficie de respuesta, donde los valores de 0,2 g/L de activador y 1,3 % v/v de fase acuosa resultaron óptimos. Al término del análisis estadístico, únicamente el activador influyó significativamente en la productividad de biomasa de las microalgas *Chlorella sp.* en el rango estudiado.
- Se caracterizó física y químicamente la fase acuosa de la carbonización hidrotermal del pergamino de café, el cual resultó con un nulo contenido de nitrógeno Kjeldahl, 15,2 mg/L de PT, pH de 4,7, conductividad de 459 µS/cm, con presencia de ácidos orgánicos y carbohidratos como el ácido láctico 66,224 mg/L y xilosa 219,637 mg/L, también micronutrientes traza como Ca 5,92 mg/L, K 76,52 mg/L, Mg 3,61 mg/L, Na 3,69 mg/L, y ausencia de Cu, Fe, y Zn.
- Se identificaron los principales grupos funcionales mediante FT-IR característicos de las microalgas secas de varias diluciones de fase acuosa y activador; entre ellos, celulosa, lípidos a manera de ésteres de ácidos grasos, carbohidratos, entre otros, como amidas y alquinos.
- Se analizó la biofijación de CO₂ de las microalgas con las condiciones de nutriente optimizado y en diferentes concentraciones del gas (5, 10, 15, 30 %), registrándose mejores resultados al 15% de CO₂ para *Chlorella sp.* En este medio, la concentración celular alcanzada en la fase exponencial fue de 0,342 g/L, la productividad de biomasa como 46 mg/Ldía, la tasa de crecimiento máxima de 0,872 día⁻¹, el tiempo de duplicación de 0,795 días, y un valor de biofijación de 71 mgL⁻¹día⁻¹; concluyéndose así, que el cultivo de la biomasa microalgal en aguas residuales provenientes de procesos hidrotermales resulta ser un enfoque innovador y sostenible para la mitigación del CO₂ a razón de la alta capacidad de fijación que presentan estos organismos fotosintéticos.

RECOMENDACIONES

- Para minimizar el error debido a cambios en el contenido de pigmentación en los ensayos microalgales que pueda afectar a la propiedad óptica y alterar la correlación entre la lectura de la absorbancia y el peso seco, se recomienda emplear curvas estándar en la fase temprana de crecimiento e incluso utilizar longitudes de onda fuera del rango de absorbancia de los pigmentos.
- Pretratar el inóculo madre y usar el mismo a lo largo de la experimentación evitando así, una posible inhibición en el crecimiento y errores posteriores en el análisis estadístico.
- Emplear más puntos experimentales en los entornos al óptimo de nutrientes para estudiar la biofijación, de tal forma que permita diferenciar con mayor profundidad el efecto de las variables independientes sobre la productividad.
- Al momento de caracterizar las muestras, tener en cuenta los límites de cuantificación de detección y de los equipos y normas usadas.
- Para mejorar la identificación de los grupos funcionales y compuestos de valor agregado mediante FT-IR, es aconsejable realizar un desengrasado previo a la muestra para eliminar la interferencia de los lípidos. Seguidamente, ejecutar un análisis del perfil lipídico (ejemplo, Soxhlet).

GLOSARIO

Celulosa: polímero lineal principal de la pared celular vegetal formado por unidades de glucopiranosas unidas por enlaces tipo éter (1,4 – β) de carácter fibroso y cristalino (Barroso, 2010, pp. 11).

***Chlorella sp.*:** Especie de alga verde unicelular y de forma elipsoidal que crece en forma de células simples. Pertenece a la división Chlorophyta y a la familia Chlorellaceae (Poddar, Sen y Martin, 2018, pp. 298-309).

Ciclo de Calvin-Benson: Conocida como “la fase oscura de la fotosíntesis”, es una de las rutas metabólicas cerradas que ocurre en los cloroplastos, específicamente en los estromas, estos hacen posible la fijación de carbono inorgánico en los organismos fotosintéticos (Torres y Cerón, 2020, pp. 25-26).

Densidad óptica: Medida rápida y no destructiva de biomasa en diferentes cultivos de microorganismos unicelulares. Gracias a que, una suspensión de células es capaz de absorber cierta cantidad de luz, permitiendo relacionar la medida directamente con la masa celular o el número de células (Griffiths et al., 2011, pp. 119-123).

Fotobiorreactor: equipo con diversos diseños en el que se da lugar el cultivo de microorganismos foto-autotróficos como las microalgas y permite controlar los parámetros de crecimiento y, por ende, obtener una mayor eficiencia de productividad, densidad celular y economía (Benavente et al., 2012, p. 2).

Fotorrespiración celular: Vía metabólica malgastadora en las plantas que tiene lugar cuando la enzima RuBisCO del ciclo de Calvin actúa sobre el oxígeno (oxigenasa) a determinada temperatura, pero no sobre el dióxido de carbono (carboxilasa), comportamiento contrario a su naturaleza, ya que es fijadora de carbono durante la fotosíntesis. Por lo que, a diferencia de la respiración, que es un proceso que permite producir energía, la fotorrespiración la consume (Wang, Stessman y Spalding, 2015, pp. 37-42).

Fotosistemas: Los pigmentos encontrados en los tilacoides de los cloroplastos es lo que se denomina fotosistemas, en síntesis, son agrupaciones funcionales que comprenden más de 200 moléculas de pigmentos. Son dos, el fotosistema I (FSI), relacionado a moléculas que absorben a longitudes de ondas largas entre los 700 nm y es comúnmente conocido como P700 y el

fotosistema II (FSII), vinculado a moléculas que absorben entre los 680 nm. por eso se los llama como P680 (Wang, Stessman y Spalding, 2015, pp. 19-22).

Genes inducibles: genes que en presencia de un sustrato actúan de manera variable y específica en dependencia de las necesidades de la célula activando o desactivando la expresión de otros genes, por ejemplo, genes implicados en el metabolismo del carbono (Taylor y Cummins, 2011, p. 1).

Hemicelulosa: polímero vegetal formado por ramificaciones de monosacáridos menos complejas que la celulosa, por ende, de carácter no cristalino y más propenso a ataques químicos (Barroso, 2010, pp. 13).

Lignina: polímero ramificado complejo, aromático y mayoritario de las biomásas lignocelulósicas junto a la celulosa y hemicelulosa formado por precursores fenólicos (Barroso, 2010, pp. 17).

Lodos activados: proceso de tratamiento de aguas más utilizado que representa una alta tasa de remoción de cargas orgánicas variables en el que se emplea el cultivo de microorganismo específicamente bacterias en suspensión (Ramirez, 2015, pp. 2).

MSR: Método de Superficie de Respuesta que permite evaluar las variables controlables de manera experimental con una variable observable, además determina una combinación de los factores que puede mejorar el rendimiento en la respuesta (Vieira et al., 2002, pp. 1-5).

Principio de parsimonia: Instaure que la mayoría de los sistemas marchan mejor si se conservan simples a que si se vuelven complejos; siendo así, la simplicidad debe ser sostenida como un objetivo clave del diseño empleado evitándose cualquier complejidad accidental (Statgraphics Centurion, 2006, pp. 22-29).

Tasa de crecimiento: Incremento en la masa celular o en el número de células por unidad de tiempo, característico para cada inóculo microalgal en su medio de cultivo o sustrato (Yousuf, 2019, pp. 1-9).

Tiempo de generación: Tiempo requerido para que, a partir de una célula madre, se formen dos células hijas, en otras palabras, es el tiempo que tarda una población microalgal en duplicarse (Yousuf, 2019, pp. 1-9).

BIBLIOGRAFÍA

ABALDE, Julio Ernesto, CID, Angeles, FIDALGO, José Pablo, TORRES, José Enrique y HERRERO, Concepción, *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. Universidad de La Coruña. 1995. S.l.: ISBN 9788497497695.

ADAMCZYK, Michał, LASEK, Janusz y SKAWIŃSKA, Agnieszka, "CO₂ Biofixation and Growth Kinetics of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis gaditana*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, vol. 179, no. 7, pp. 1-14. ISSN 15590291. DOI 10.1007/s12010-016-2062-3.

AHN, Dae Hee, CHANG, Won Seok y YOON, Tai Il, "Dyestuff wastewater treatment using chemical oxidation, physical adsorption and fixed bed biofilm process". *Process Biochemistry*, 1999, vol. 34, no. 5, pp. 429-439. ISSN 13595113. DOI 10.1016/S0032-9592(98)00111-3.

ALVAREZ, Brenda Judith, *Caracterización del pericarpio, mesocarpio y endocarpio del fruto del café para la producción de aglomerados energéticos* [en línea]. S.l.: Universidad Veracruzana. 2014. Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46427/QuirozCortesMCarmen.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.

ÁLVAREZ, Consuelo, GARCÍA, Pizarro y FOLGUERAS, María, "CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE BIOMASA Y SU RELACIÓN CON EL PODER CALORÍFICO". *Departamento de Energía* [en línea], 2013, pp. 1-12. [Consulta: 18 diciembre 2021. Disponible en: https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/17777/TFM_Ana_AlvarezProteg.pdf?sequence=6&isAllowed=y].

APHA, "Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water". [en línea]. S.l.: 1999, Disponible en: [https://www.uvm.edu/bwrl/lab_docs/protocols/4500-N\(org\)-ABCD_Total_dissolved_nitrogen_\(SM\).PDF](https://www.uvm.edu/bwrl/lab_docs/protocols/4500-N(org)-ABCD_Total_dissolved_nitrogen_(SM).PDF).

ARIF, Muhammad, LI, Yuxi, EL-DALATONY, Marwa M., ZHANG, Chunjiang, LI, Xiangkai y SALAMA, El Sayed, "A complete characterization of microalgal biomass through FTIR/TGA/CHNS analysis: An approach for biofuel generation and nutrients removal". *Renewable Energy* [en línea], 2021, vol. 163, pp. 1973-1982. ISSN 18790682. DOI 10.1016/j.renene.2020.10.066.

ARROYO, Flavio y MIGUEL, Luis, "Análisis de la variación de las emisiones de CO₂ y posibles escenarios al 2030 en Ecuador". *Revista ESPACIOS* [en línea], 2019, vol. 40, no. 13, pp. 5-22. Disponible en: <http://www.revistaespacios.com/a19v40n13/a19v40n13p05.pdf>.

BAGNOUD-VELÁSQUEZ, M., SCHMID-STAIGER, U., PENG, G., VOGEL, F. y LUDWIG, Ch, "First developments towards closing the nutrient cycle in a biofuel production process". *Algal Research* [en línea], 2015, vol. 8, pp. 76-82. ISSN 22119264. DOI 10.1016/j.algal.2014.12.012.

BARRIE, Len y BRAATHEN, Geir, "Can we see the impact of COVID-19 confinement measures on CO₂ levels in the atmosphere?". *Weather Climate Water* [en línea], 2020, vol. 1, no. 16, pp. 1-9. [Consulta: 18 diciembre 2021]. ISSN 2078-0796. Disponible en: <https://ig3is.wmo.int>.

BARROSO, Miguel, "Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería". *Universidad Politécnica de Madrid* [en línea], 2010, pp. 151. Disponible en: http://oa.upm.es/10559/1/MIGUEL_BARROSO_CASILLAS.pdf.

BELETE, Yonas Zeslase, LEU, Stefan, BOUSSIBA, Sammy, ZORIN, Boris, POSTEN, Clemens, THOMSEN, Laurenz, WANG, Song, GROSS, Amit y BERNSTEIN, Roy, "Characterization and utilization of hydrothermal carbonization aqueous phase as nutrient source for microalgal growth". *Bioresource Technology* [en línea], 2019, vol. 290, no. July, pp. 121758. ISSN 18732976. DOI 10.1016/j.biortech.2019.121758.

BEN, "Balance energético nacional 2020. Energía, sociedad y ambiente". *Ministerio de Energía y Recursos Naturales y no Renovables* [en línea], 2020, pp. 30. Disponible en: <https://www.recursoyenergia.gob.ec/wp-content/uploads/2021/09/01-CAPÍTULO-01BEN-2020-Web-17-46.pdf>.

BENAVENTE, J., MONTAÑEZ, J., AGUILAR, C., MÉNDEZ, A. y VALDIVIA, B., "Tecnología De Cultivo De Microalgas En Fotobiorreactores". *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2012, vol. 4, no. 7, pp. 13.

BHOLA, Virthie Kemraj, SWALAHA, Feroz Mahomed, NASR, Mahmoud, KUMARI, Sheena y BUX, Faizal, "Physiological responses of carbon-sequestering microalgae to elevated carbon regimes". *European Journal of Phycology* [en línea], 2016, vol. 51, no. 4, pp. 401-412. ISSN 14694433. DOI 10.1080/09670262.2016.1193902.

CASTRO, Jackeline de Siqueira, ASSEMANY, Paula Peixoto, CARNEIRO, Angélica Cássia de Oliveira, FERREIRA, Jéssica, DE JESUS JÚNIOR, Maurino Magno, RODRIGUES, Fábio de Ávila y CALIJURI, Maria Lúcia, "Hydrothermal carbonization of microalgae biomass produced in agro-industrial effluent: Products, characterization and applications". *Science of the Total Environment*, 2021, vol. 768. ISSN 18791026. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.144480.

CHÁVEZ, Cesar, "Detección de metales pesados en agua". *Instituto nacional de astrofísica, óptica y electrónica* [en línea], 2011, vol. 0, pp. 51-54. Disponible en: <https://inaoe.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1009/671/1/ChavezVC.pdf>.

CLAVIJO PÁEZ, Katherin Andrea, *Caracterización fenotípica de microalgas y cianobacterias del fitoplancton del embalse La Mica* [en línea]. Quito: PUCE - Quito. 2021. [Consulta: 18 diciembre 2021]. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/18504>.

CLEMENT, Barbara, "Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO₂". *HAL Open Science* [en línea], 2012, pp. 233. Disponible en: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00697006/document>.

CUJI, Paola, "Estudio de captura de carbono para la producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal, empleando fotobiorreactores – Instituto de Investigación Geológico y Energético". *Instituto de Investigación Geológico y Energético* [en línea]. 2020, 2020, [Consulta: 18 diciembre 2021]. Disponible en: <https://www.geoenergia.gob.ec/estudio-de-captura-de-carbono-para-la-produccion-de-biocombustibles-a-partir-de-biomasa-microalgal-empleando-fotobiorreactores/>.

DU, Zhenyi, HU, Bing, SHI, Aimin, MA, Xiaochen, CHENG, Yanling, CHEN, Paul, LIU, Yuhuan, LIN, Xiangyang y RUAN, Roger, "Cultivation of a microalga *Chlorella vulgaris* using recycled aqueous phase nutrients from hydrothermal carbonization process". *Bioresource Technology*, 2012, vol. 126, pp. 354-357. ISSN 09608524. DOI 10.1016/j.biortech.2012.09.062.

DUYGU, Dilek, UDOH, Abel, TULAY, Ozer, AKBULUT, Aydin, ERKAYA, Ilkay, YILDIZ, Kasim y GULER, Deniz, "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833". *African Journal of Biotechnology*, 2012, vol. 11, no. 16, pp. 3817-3824. ISSN 1684-5315. DOI 10.5897/ajb11.1863.

ESPINOSA, María del Carmen, LEÓN, Yadiana y RODRÍGUEZ, Xiomara, "Problemática de la determinación de especies nitrogenadas (nitrógeno total y amoniacal) en aguas residuales". *Revista Cenic* [en línea], 2013, vol. 44, pp. 1-12. Disponible en: <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCQ/articulos/problemática-de-la-determinación-de-especies-nitrogenadas-nitrógeno-total-y-amoniacaal-en>.

FAN, Jianhua, XU, Hui, LUO, Yuanchan, WAN, Minxi, HUANG, Jianke, WANG, Weiliang y LI, Yuanguang, "Impacts of CO₂ concentration on growth, lipid accumulation, and carbon-concentrating-mechanism-related gene expression in oleaginous *Chlorella*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, vol. 99, no. 5, pp. 2451-2462. ISSN 14320614. DOI 10.1007/s00253-015-6397-4.

FARIAS, Carlos Eduardo y SFORZA, Eleonora, "Carbohydrate productivity in continuous reactor under nitrogen limitation: Effect of light and residence time on nutrient uptake in *Chlorella vulgaris*". *Process Biochemistry* [en línea], 2016, vol. 51, no. 12, pp. 7. ISSN 13595113. DOI 10.1016/j.procbio.2016.09.015.

FENG, Yuanyuan, WARNER, Mark E., ZHANG, Yaohong, SUN, Jun, FU, Fei Xue, ROSE, Julie M. y HUTCHINS, David A., "Interactive effects of increased pCO₂, temperature and irradiance on the marine coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae)". *European Journal of Phycology*, 2008, vol. 43, no. 1, pp. 87-98. ISSN 09670262. DOI 10.1080/09670260701664674.

GOD, Jean, "Aplicación de microalgas para la remoción de nutrientes en efluentes agrícolas". *Escuela Agrícola Panamericana* [en línea], 2020, pp. 38. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6747/1/IAD-2020-T020.pdf>.

GÓMEZ, Carla, *Evaluación de la incidencia de la zona geográfica de Costa Rica en la composición fisicoquímica de la broza de café para su potencial uso en sistemas de gasificación de lecho descendente* [en línea]. Costa Rica: Universidad de Costa Rica. 2018. [Consulta: 18 diciembre 2021]. Disponible en: <https://iberomasacyted.blogs.upv.es/files/2019/01/Biomasa-café.pdf>.

GRIFFITHS, Melinda J., GARCIN, Clive, VAN HILLE, Robert P. y HARRISON, Susan T.L., "Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density". *Journal of Microbiological Methods*, 2011, vol. 85, no. 2, pp. 119-123. ISSN 01677012. DOI 10.1016/j.mimet.2011.02.005.

HACH COMPANY, "Manual de analisis de agua". *Cell* [en línea], 2000, vol. 3, no. 970, pp. 220. Disponible en: <https://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639984469>.

HACH COMPANY, "BODTrak™ II Manual de Usuario". [en línea]. China: 2010, Disponible en: www.hach.com_fmmimghach_CODE3ADOC022.92.pdf.

HACH COMPANY, "¿Qué es la conductividad?". [en línea]. S.l.: 2022, Disponible en: https://latam.hach.com/cms-portals/hach_mx/cms/documents/Que-s-la-conductividad-Final.pdf.

HERNÁNDEZ, Roberto, *Metodología de la Investigación*. 5. s.n. 2015. S.l.: ISBN 9789896540821.

HOGNON, Céline, DELRUE, Florian, TEXIER, Jonathan, GRATEAU, Maguelone, THIERY, Sébastien, MILLER, Hélène y ROUBAUD, Anne, "Comparison of pyrolysis and hydrothermal liquefaction of *Chlamydomonas reinhardtii*. Growth studies on the recovered hydrothermal aqueous phase". *Biomass and Bioenergy*, 2015, vol. 73, pp. 23-31. ISSN 18732909. DOI 10.1016/j.biombioe.2014.11.025.

IPCC, "Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change". [en línea]. United States: 2021, [Consulta: 18 diciembre 2021]. Disponible en: https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/downloads/report/IPCC_AR6_WGI_Full_Report_smaller.pdf.

J.P. SELECTA S.A., "EXTRACTOR PARA LA DETERMINACIÓN DE CELULOSA Y FIBRAS". [en línea]. Barcelona, España: 2012, Disponible en: <https://www.manualslib.es/manual/167745/J-P-Selecta-4000599.html?page=17#manual>.

JIN, Hai Feng, LIM, Byung Ran y LEE, Kisay, "Influence of nitrate feeding on carbon dioxide fixation by microalgae". *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 2006, vol. 41, no. 12, pp. 2813-2824. ISSN 10934529. DOI 10.1080/10934520600967928.

KUMAR, Kanhaiya y DAS, Debabrata, "Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in airlift and bubble column photobioreactors". *Bioresource Technology* [en línea], 2012, vol. 116, pp. 307-313. ISSN 09608524. DOI 10.1016/j.biortech.2012.03.074.

LACHOS, Daniel, TORRES, Paulo, ABAIDE, Ederson R., ZABOT, Giovani L. y CASTILHOS, Fernanda, "Hydrothermal carbonization and Liquefaction: differences, progress, challenges, and opportunities". *Bioresource Technology* [en línea], 2022, vol. 343, pp. 126084. [Consulta: 18 diciembre 2021]. ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/J.BIORTECH.2021.126084.

LENG, Lijian, LI, Jun, WEN, Zhiyou y ZHOU, Wenguang, "Use of microalgae to recycle nutrients in aqueous phase derived from hydrothermal liquefaction process". *Bioresource Technology* [en línea], 2018, vol. 256, pp. 529-542. ISSN 18732976. DOI 10.1016/j.biortech.2018.01.121.

LEÓN, Antonio, LEÓN, Rosa, DÍAZ, Encarnación, VIGARA, Javier y RAPOSO, Sara, "Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*". *New BIOTECHNOLOGY* [en línea], 2019, vol. 51, no. February 2018, pp. 31-38. ISSN 1871-6784. DOI 10.1016/j.nbt.2019.02.001.

LOPEZ, Liz Katerine, *Efecto de tres medios de cultivo en el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas* [en línea]. S.I.: UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ. 2017. Disponible en: <http://repositorio.ucp.edu.pe/handle/UCP/319>.

LV, Jian Ming, CHENG, Li Hua, XU, Xin Hua, ZHANG, Lin y CHEN, Huan Lin, "Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions". *Bioresource Technology* [en línea], 2010, vol. 101, no. 17, pp. 6797-6804. ISSN 09608524. DOI 10.1016/j.biortech.2010.03.120.

MANALS CUTIÑO, Enma, SALAS TORT, Dolores y PENEDO MEDINA, Margarita, "Caracterización de la biomasa vegetal cascarilla de café". *Caracterización de la biomasa vegetal cascarilla de café*, 2018, vol. 39, no. 1, pp. 192-207. ISSN 2224-6185. DOI 10.1590/2224-6185.2019.1.%x.

MENDOZA, Clara Lisseth, SERMYAGINA, Ekaterina, SAARI, Jussi, SILVA DE JESUS, Marcia, CARDOSO, Marcelo, MATHEUS DE ALMEIDA, Gustavo y VAKKILAINEN, Esa, "Hydrothermal carbonization of lignocellulosic agro-forest based biomass residues". *Biomass and Bioenergy*, 2021, vol. 147, pp. 106004. ISSN 0961-9534. DOI 10.1016/J.BIOMBIOE.2021.106004.

MENG, Tan Kean, KASSIM, Mohd Asyraf y CHEIRSILP, Benjamas, "Mixotrophic Cultivation: Biomass and Biochemical Biosynthesis for Biofuel Production". *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 2020, pp. 51-67. DOI 10.1016/b978-0-12-817536-1.00004-7.

MENG, Tan Keang y KASSIM, Mohd Asyraf, "Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production". *Science of the Total Environment*, 2017, vol. 584-585, pp. 1121-1129. ISSN 18791026. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.01.172.

MERA, Moraima y SIMBAÑA, Edwin, "Evaluación de la capacidad calorífica de biocombustible sólido a partir de residuos lignocelulósicos de café frente a leña de espino y eucalipto". *Axioma*, 2016, vol. 15, pp. 35-41.

MONDRAGÓN, Pedro, "Espectroscopia de infrarrojo para todos". *Neural Regeneration Research* [en línea]. S.l.: 2015, Disponible en: https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b7c09fdc1.pdf.

NIGRIS, A., GRAU, C., AZAMBUYA, S. y BARBOZA, N., "Determinación de Fósforo reactivo suspendido o disuelto en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales". [en línea]. S.l.: 2017, Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/sites/ministerio-ambiente/files/documentos/publicaciones/4012UY.pdf>.

PEÑAHERRERA, Sophia, *Análisis inicial de la relación entre la composición química de diferentes calidades de de café del Ecuador y sus características organolépticas finales* [en línea]. S.l.: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR. 2019. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18231/1/T-UCE-0017-IQU-034.pdf>.

PHUKAN, Mayur M., CHUTIA, Rahul S., KONWAR, B.K. y KATAKI, R., "Microalgae Chlorella as a potential bio-energy feedstock". *Applied Energy* [en línea], 2011, vol. 88, no. 10, pp. 3307-3312. ISSN 03062619. DOI 10.1016/j.apenergy.2010.11.026.

PIRES, J.C.M., ALVIM-FERRAZ, M.C.M., MARTINS, F.G. y SIMÕES, M., "Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [en línea], 2012, vol. 16, no. 5, pp. 3043-3053. ISSN 13640321. DOI 10.1016/j.rser.2012.02.055.

PODDAR, Nature, SEN, Ramkrishna y MARTIN, Gregory J.O., "Glycerol and nitrate utilisation by marine microalgae *Nannochloropsis salina* and *Chlorella* sp. and associated bacteria during mixotrophic and heterotrophic growth". *Algal Research* [en línea], 2018, vol. 33, no. February, pp. 298-309. ISSN 22119264. DOI 10.1016/j.algal.2018.06.002.

RAMIREZ, Esperanza, "Fundamentos Del Proceso De Lodos Activados". *Fundamentos teóricos de lodos activados y aereación extendida* [en línea], 2015, pp. 36. Disponible en: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloII/1Fundamentosdelprocesodelodosactivados.pdf>.

SÁNCHEZ, Edgar, TORRES, Gleidys y ESQUIVEL, Rodrigo, "Desempeño de un material granular estabilizado con cemento cuando se aplica carga a compresión". *Tecnura* [en línea], 2019, vol. 23, no. 60, pp. 59-71. DOI 10.14483/22487638.14640.

SICLARI, Gabriela Paola, "Amenazas de cambio climático, métricas de mitigación y adaptación en ciudades de América Latina y el Caribe DOCUMENTOS DE PROYECTOS". *CEPAL* [en línea], 2021, pp. 1-89. [Consulta: 18 diciembre 2021]. Disponible en: www.cepal.org/apps.

SLUITER, A., HAMES, B., HYMAN, D., PAYNE, C., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. y NREL, J. Wolfe, "Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples". *National Renewable Energy Laboratory (NREL)* [en línea], 2008, no. March, pp. 3-5. Disponible en: <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42621.pdf>.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J. y TEMPLETON, D., "Determination of Ash in Biomass". *National Renewable Energy Laboratory (NREL)* [en línea], 2008, vol. 36, no. 4, pp. 1-8. ISSN 10005048. Disponible en: <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>.

SOSA, Eliani, *Cultivo de la microalga Chlorella sp. en vinazas residuales de la producción de etanol y biogás*. s.n. 2019. S.l.: ISBN 4228150314.

STATGRAPHICS CENTURION, "Diseño de Experimentos – Diseños de Cribado". [en línea]. S.l.: 2006, Disponible en: <https://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE - Disenos de Cribado.pdf>.

SUAREZ, Daniela y MORALES, Yovanny, "Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas". *América Revista Semilleros: Formación Investigativa* [en línea], 2018, vol. 4, no. 1, pp. 8-13. ISSN 2619-5267. Disponible en: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf>.

TANG, Dahai, HAN, Wei, LI, Penglin, MIAO, Xiaoling y ZHONG, Jianjiang, "CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels". *Bioresource Technology* [en línea], 2011, vol. 102, no. 3, pp. 3071-3076. ISSN 09608524. DOI 10.1016/j.biortech.2010.10.047.

TARHAN, Seray, KOÇER, Anıl, ÖZÇIMEN, Didem, GÖKALP, İskender, TEVFIK KOÇER, Anıl y GÖKALP, İskender, "Utilization of hydrothermal process water for microalgal growth Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences Utilization of hydrothermal process water for microalgal growth". *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2020, vol. 3, no. 1, pp. 42-47.

TARHAN, Seray Zora, KOÇER, Anıl Tevfik, ÖZÇIMEN, Didem y GÖKALP, İskender, "Cultivation of green microalgae by recovering aqueous nutrients in hydrothermal carbonization process water of biomass wastes". *Journal of Water Process Engineering*, 2021, vol. 40, no. June 2020. ISSN 22147144. DOI 10.1016/j.jwpe.2020.101783.

TAYLOR, Cormac y CUMMINS, Eoin, "Regulation of gene expression by carbon dioxide". *Journal of Physiology*, 2011, vol. 589, no. 4, pp. 7. ISSN 00223751. DOI 10.1113/jphysiol.2010.201467.

TEJEDA, Lesly, HENAO, Daniela, ALVEAR, Mario y CASTILLO, Carlos, "Characterization and lipid profile of oil from microalgae". *Revista Facultad de Ingeniería*, 2015, vol. 24, no. 39, pp. 43-54. ISSN 24222844. DOI 10.19053/01211129.3550.

TORRES, Birggit Banesa y CERÓN, Francly Natalia, Evaluación De La Captura De Co₂ Para La Mejora Del Biogás, Mediante Un Cultivo De La Microalga *Chlorella Vulgaris* En Un Sistema De Biorreactores a Nivel Laboratorio. [en línea]. S.l.: FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA, Colombia. 2020. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.11839/8133>.

VAN, S. y LAURENS, L.M.L., "Total Carbohydrate Content Determination of Microalgal Biomass by Acid Hydrolysis Followed by Spectrophotometry or Liquid Chromatography". *Methods in Molecular Biology*, 2020, vol. 1980, pp. 191-202. ISSN 19406029. DOI

10.1007/7651_2017_106.

VIEIRA, Jorge, COLLA, Luciane Maria, FILHO, Paulo Duarte, KABKE, Keli y WEBER, Adriana, "Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, vol. 18, no. 7, pp. 603-607. ISSN 09593993. DOI 10.1023/A:1016822717583.

WANG, Liang, MIN, Min, LI, Yecong, CHEN, Paul, CHEN, Yifeng, LIU, Yuhuan, WANG, Yingkuan y RUAN, Roger, "Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, vol. 162, no. 4, pp. 1174-1186. ISSN 02732289. DOI 10.1007/s12010-009-8866-7.

WANG, Yingjun, STESSMAN, Dan y SPALDING, Martin, "The CO₂ concentrating mechanism and photosynthetic carbon assimilation in limiting CO₂: How *Chlamydomonas* works against the gradient". *Plant Journal*, 2015, vol. 82, no. 3, pp. 429-448. ISSN 1365313X. DOI 10.1111/tpj.12829.

YAO, Changhong, PAN, Yanfei, LU, Hongbin, WU, Peichun, MENG, Yingying, CAO, Xupeng y XUE, Song, "Utilization of recovered nitrogen from hydrothermal carbonization process by *Arthrospira platensis*". *Bioresource Technology* [en línea], 2016, vol. 212, pp. 26-34. ISSN 18732976. DOI 10.1016/j.biortech.2016.03.166.

YATIRAJULA, Suresh Kumar, SHRIVASTAVA, Anuj, SAXENA, Vinod Kumar y KODAVATY, Jagadeeshwar, "Flow behavior analysis of *Chlorella Vulgaris* microalgal biomass". *Heliyon* [en línea], 2019, vol. 5, no. 6, pp. e01845. ISSN 24058440. DOI 10.1016/j.heliyon.2019.e01845.

YEN, Hong Wei, HU, I. Chen, CHEN, Chun Yen, HO, Shih Hsin, LEE, Duu Jong y CHANG, Jo Shu, "Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products". *Bioresource Technology* [en línea], 2013, vol. 135, pp. 166-174. ISSN 18732976. DOI 10.1016/j.biortech.2012.10.099.

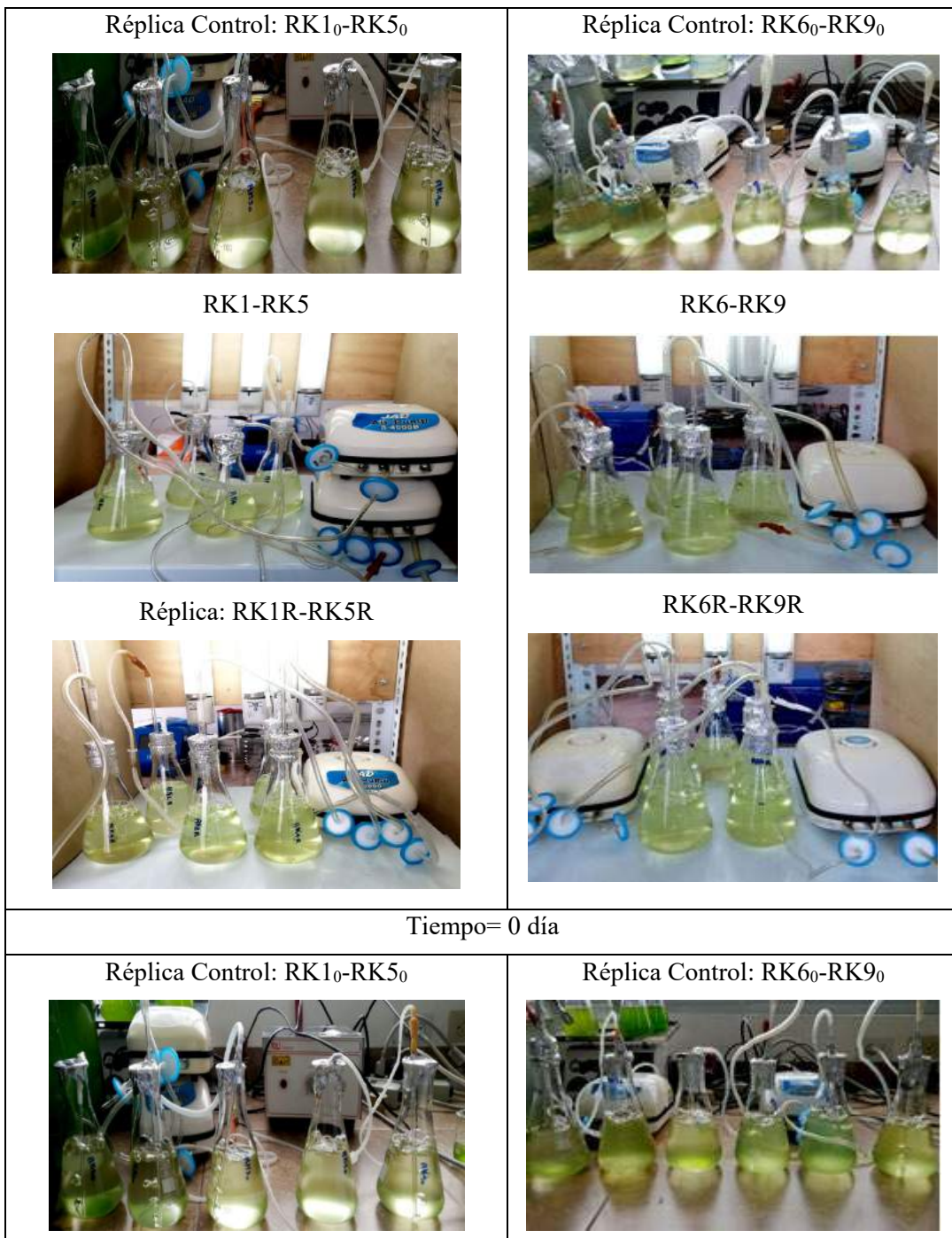
YOUSUF, Abu, *Fundamentals of microalgae cultivation* [en línea]. Elsevier Inc. 2019. S.l.: ISBN 9780128175361. DOI 10.1016/B978-0-12-817536-1.00001-1.

ZUCCARO, Gaetano, YOUSUF, Abu, POLLIO, Antonino y STEYER, Jean Philippe,
"Microalgae cultivation systems". *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 2019, pp. 11-
29. DOI 10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3.

ANEXOS

ANEXO A: CONTROL DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR DE LOS CULTIVOS DE *Chlorella sp.*

De acuerdo con la planificación de ensayos en la Etapa I, se presenta la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.*, monitoreada por OD_{680nm}. Las evoluciones de los cultivos en lotes se indican a continuación:



RK1-RK5



Réplica: RK1R-RK5R



RK6-RK9



Réplica: RK6R-RK9R



Tiempo= 2 días

Réplica Control: RK1₀-RK5₀



RK1-RK5



Réplica: RK1R-RK5R



Réplica Control: RK6₀-RK9₀



RK6-RK9



Réplica: RK6R-RK9R



Tiempo= 3 días

Réplica Control: RK1₀-RK5₀



RK1-RK5



Réplica: RK1R-RK5R



Réplica Control: RK6₀-RK9₀



RK6-RK9



Réplica: RK6R-RK9R



Tiempo= 7 días

Réplica Control: RK1₀-RK5₀



RK1-RK5





Réplica Control: RK6₀-RK9₀







RK6-RK9










<p>Réplica: RK1R-RK5R</p> 	<p>Réplica: RK6R-RK9R</p> 
<p>Tiempo= 11 días</p>	
<p>Condiciones de los cultivos por lotes: rangos de concentraciones entre (0,5-3,0 % v/v) de fase acuosa HTC del pergamino de café y (0,2-0,6 g/L) de acetato de sodio como activador, inóculo al 10%, temperatura ambiente, aireados al flujo máximo de las bombas air pump S4000B y acompañados de luz blanca 1000lux.</p>	

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

De acuerdo con la planificación de ensayos en la Etapa II, se presenta la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.*, monitoreada por OD_{680nm}. Las evoluciones de los cultivos en lotes se indican a continuación:

<p>5% de CO₂</p>	
<p>RL1- RL1₀-RL1R</p> 	<p>RL1- RL1₀-RL1R</p> 
<p>Tiempo= 0 día</p>	<p>Tiempo= 1 día</p>
<p>RL1- RL1₀-RL1R</p> 	<p>RL1- RL1₀-RL1R</p> 
<p>Tiempo= 2 días</p>	<p>Tiempo= 6 días</p>

<p>RL1- RL1₀-RL1R</p> 	<p>RL1- RL1₀-RL1R</p> 
<p>Tiempo= 8 días</p>	<p>Tiempo= 10 días</p>
<p>10% de CO₂</p>	
<p>RL2- RL2₀-RL2R</p> 	<p>RL2- RL2₀-RL2R</p> 
<p>Tiempo= 0 días</p>	<p>Tiempo= 4 días</p>
<p>RL2- RL2₀-RL2R</p> 	<p>RL2- RL2₀-RL2R</p> 
<p>Tiempo= 6 días</p>	<p>Tiempo= 7 días</p>
<p>RL2- RL2₀-RL2</p> 	
<p>Tiempo= 11 días</p>	

30% de CO₂

RL3- RL3₀-RL3R



Tiempo= 0 días

RL3- RL3₀-RL3R



Tiempo= 1 días

RL3- RL3₀-RL3R



Tiempo= 3 días

RL3- RL3₀-RL3R



Tiempo= 7 días

RL3- RL3₀-RL3R



Tiempo= 9 días

RL3- RL3₀-RL3R



Tiempo= 11 días




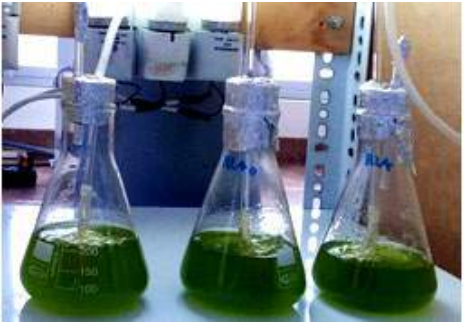
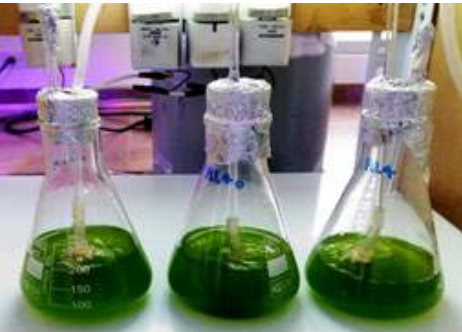

15% de CO₂

RL4- RL4₀-RL4R



RL4- RL4₀-RL4R



<p>Tiempo= 0 días</p> <p>RL4- RL4₀-RL4R</p>	<p>Tiempo= 1 días</p> <p>RL4- RL4₀-RL4R</p>
	
<p>Tiempo= 2 días</p> <p>RL4- RL4₀-RL4R</p>	<p>Tiempo= 3 días</p> <p>RL4- RL4₀-RL4R</p>
	
<p>Tiempo= 4 días</p> <p>RL4- RL4₀-RL4R</p>	<p>Tiempo= 8 días</p> <p>RL4- RL4₀-RL4R</p>
	
<p>Tiempo= 10 días</p>	<p>Tiempo= 11 días</p>
<p>Condiciones de los cultivos por lotes: rangos de concentraciones entre 1,3 % v/v de fase acuosa HTC del pergamino de café y 0,2 g/L de acetato de sodio como activador, inóculo al 10%, temperatura ambiente, inyección de CO₂ al 5, 10, 15, 30% v/v y acompañados de luz blanca 1000lux.</p>	

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

ANEXO B: ANÁLISIS DE NITRÓGENO KJELDAHL TOTAL.

Se presenta a continuación el resultado emitido por LABOLAB, Laboratorio de Análisis de Alimentos, Aguas y Afines, con ACREDITACIÓN N° SAE LEN 06-001 que cumple con los requerimientos de la norma ISO/IEC 17025, realizada a la fase acuosa HTC del pergamino de café por el método estándar 4500N / Kjeldahl:

LABOLAB
ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES
INFORME DE RESULTADOS

*Orden de trabajo N°220576
Informe N° 220576
Hoja 1 de 1*

DATOS PROPORCIONADOS POR EL CLIENTE

Nombre: MAYRA SILVANA ANDRADE GUERRERO
Dirección: Los Cóndores
Muestra: Fase acuosa del pergamino del café por HTC
Descripción de la muestra: Líquido
Fecha Elaboración: 21 de febrero del 2022
Fecha Vencimiento: 25 de febrero del 2022
Fecha de Toma: ---
Lote: ---
Localización: ---
Envase: Tubos de centrifuga
Conservación de la muestra: Refrigeración

DATOS DEL LABORATORIO

Fecha de recepción: 21 de febrero del 2022
Toma de muestra por: Cliente
Fecha de realización del ensayo: 21 - 24 de febrero del 2022
Fecha de emisión del informe: 02 de marzo del 2022
Condiciones ambientales: 21,5°C 61%HR

ANÁLISIS QUÍMICO:

PARÁMETRO	UNIDAD	MÉTODO	RESULTADO
Nitrogeno total	%	Kjeldahl	0,00

Cecilia Luzuriaga
Dra. Cecilia Luzuriaga
GERENTE GENERAL

El presente informe solo es válido para la muestra analizada tal como fue recibida en LABOLAB.
LABOLAB no se responsabiliza por los datos proporcionados por el cliente.
Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.
Los apuntes e interpretaciones no se encuentran dentro del alcance de acreditación del SAE.

LABOLAB
ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES

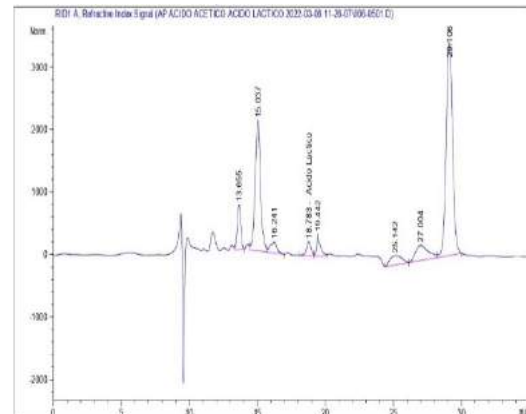
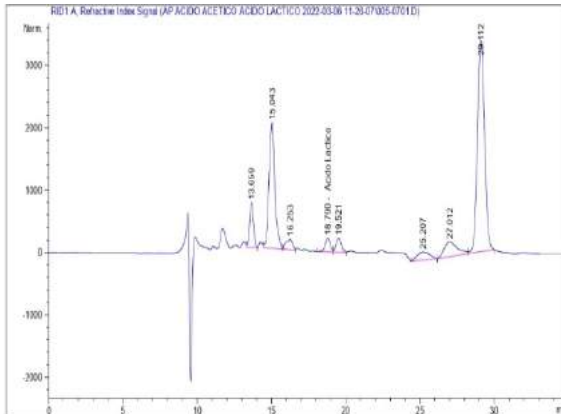
INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA NOTIFICACION SANITARIA
Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, sueros, melazas pesadas y 6009
Fco. Andrés Masín ET-28 y Diego de Almagra. Telf.: 3661-228 / 3581-358 / 3138-581 / 3138-534 Cel.: 999 959 6412 / 999 844 3111 / 999 798 1591
E-mail: secretaria@labolab.com.ec / pericard@labolab.com.ec / cecilia@labolab.com.ec / inform@labolab.com.ec
www.labolab.com.ec
Quito - Ecuador

Fuente: Labolab, 2022.

ANEXO C: DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y CARBOHIDRATOS POR HPLC.

Se presenta a continuación los resultados emitidos por el laboratorio de Biomasa del IIGE sobre ácidos orgánicos (ácido láctico y acético) y carbohidratos (glucosa, xilosa, y celobiosa), realizada a la fase acuosa HTC del pergamino de café por HPLC:

Resultados por triplicado en muestras de AP.



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Monday, March 07, 2022 11:27:22 AM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Ant/Area	Amount [g/l]	Grp Name
18.798	BV	5352.71924	1.24747e-5	6.67737e-2	Acido Lactico
22.488	-	-	-	-	Acido acetico

Totals : 6.67737e-2

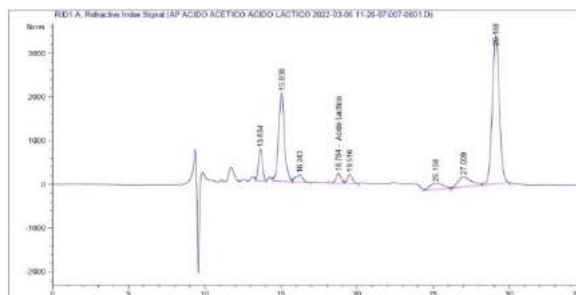
External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Monday, March 07, 2022 11:27:22 AM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Ant/Area	Amount [g/l]	Grp Name
18.783	BV	5232.83938	1.25890e-5	6.54576e-2	Acido Lactico
22.488	-	-	-	-	Acido acetico

Totals : 6.54576e-2



External Standard Report

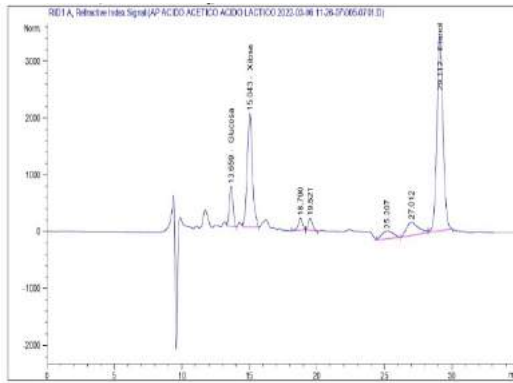
Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Monday, March 07, 2022 11:27:22 AM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Ant/Area	Amount [g/l]	Grp Name
18.784	BV	5322.43945	1.24832e-5	6.64412e-2	Acido Lactico
22.488	-	-	-	-	Acido acetico

Totals : 6.64412e-2

Resultados por triplicado en muestras de AP:

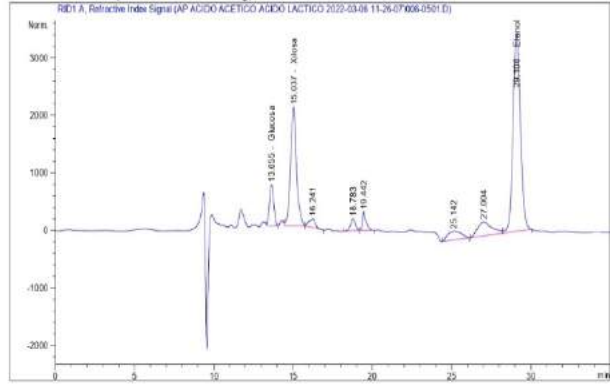


External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 3/7/2022 11:42:19 AM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/l]	Grp Name
11.286	-	-	-	-	Celobiosa
13.655 HB	1.29660e4	0.00000	0.00000	0.00000	Glucosa
15.043 HB	5.26919e4	4.87852e-6	1.14904e-1		Xilosa
29.112 HBA	1.18612e5	1.25463e-5	1.38777		Etolol
Totals :				1.68267	

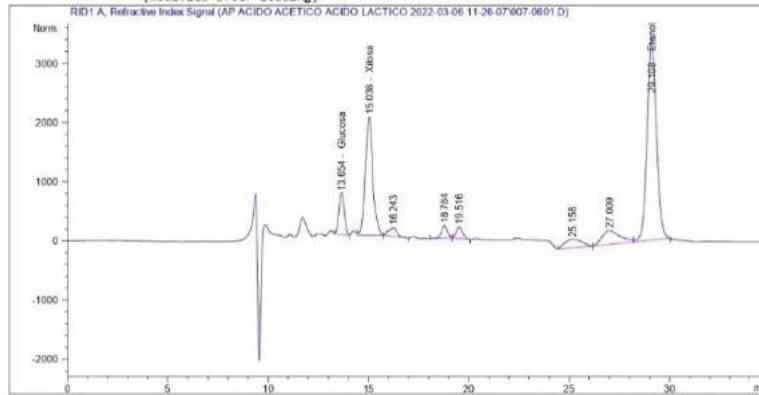


External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 3/7/2022 11:42:19 AM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/l]	Grp Name
11.286	-	-	-	-	Celobiosa
13.655 HB	1.38464e4	0.00000	0.00000	0.00000	Glucosa
15.037 HB	5.53474e4	4.13422e-6	2.28818e-1		Xilosa
29.186 HBA	1.12142e5	1.25456e-5	1.40689		Etolol
Totals :				1.63571	



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : 3/7/2022 11:42:19 AM
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs


Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [g/l]	Grp Name
11.206	-	-	-	-	Celobiosa
13.654 HB	1.31326e4	0.00000	0.00000	0.00000	Glucosa
15.038 HH	5.27462e4	4.07971e-6	2.15189e-1		Xilosa
29.108 HBA	1.11419e5	1.25469e-5	1.39786		Etolol
Totals :				1.61305	

Fuente: IIGE, 2022.

ANEXO D: CUANTIFICACIÓN DE METALES TRAZA POR ABSORCIÓN ATÓMICA.

Se presenta a continuación los resultados emitidos por el departamento de ciencia de alimentos y biotecnología (DECAB) para la cuantificación de metales traza (Ca, Cu, Fe, Mg, K, Na y Zn) empleando la normativa AOAC realizada a la fase acuosa HTC del pergamino de café por absorción atómica:

	DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA (DECAB) Ladrón de Guevara E:1-253, Edificio 19- segundo piso Telf: 2976300 ext4236, email: decab@epn.edu.ec PO Box 17-01-2759 - Quito-Ecuador	CÓDIGO: F-PT-7.7-01-04 FECHA DE VIGENCIA: 12-12-2019 VERSION: 02	
	ISO/IEC 17025		

INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO O TRABAJO

CLIENTE/EMPRESA: Andrade Guerrero Mayra **INFORME No:** IE-AAS-22-002
Persona de contacto: Mayra Andrade **Teléfono:** 0986464486
Dirección cliente: Cda Los Cóndores/ Calle S46/Casa OE11-56 **Fax:**
Correo electrónico: mayra.andrade@epoch.edu.ec **Tipo de muestra:** líquida
Fecha de muestreo: NA (proporcionada por el cliente)
Referencia al plan y método de muestreo: NA (proporcionada por el cliente)
Fecha de recepción muestra en SC: 30/03/2022
Fecha de realización análisis: 31/03/2022-11/04/2022
Fecha de emisión informe: 27/04/2022
Condiciones ambientales (T, HR): NA (si aplica de acuerdo con el método)

ORDEN DE TRABAJO: DC-OT0028-2022

IDENTIFICACIÓN DE LA(S) MUESTRA(S) Y SERVICIO (S)



No. muestra	ID Muestra	Descripción muestra	Servicio/Analito	Laboratorio
1	DC-MU7721	Fase acuosa de pergamino de café HTC (180 C)	Cuantificación de calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio, sodio y zinc	Absorción Atómica

RESULTADOS

No. muestra	Servicio/Analito	Resultado	Unidades	Método
DC-MU7721	Ca	5.92	mg/ L muestra	AOAC Official Method 991.25 Calcium, Magnesium y Phosphorus in Cheese Atomic Absorption Spectrometric and colorimetric methods
	Cu	≤ LOC	mg/ L muestra	AOAC Official Method 971.20 Cooper and Nickel in Tea: Atomic Absorption Spectrometric Method
	Fe	≤ LOC	mg/ L muestra	AOAC Official Method 971.20 Cooper and Nickel in Tea: Atomic Absorption Spectrometric Method
	Mg	3.61	mg/ L muestra	AOAC 991.25 Calcium, Magnesium y Phosphorus in Cheese Atomic Absorption Spectrometric and colorimetric methods

INFORME No: IE-AAS-22-002
 Página 1 de 2

Fuente: DECAB, 2022.

	DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA (DECAB) Ladrón de Guevara E11.253, Edificio 19 - segundo piso Telf: 2976300 ext4236, email: decab@esagon.edu.ec PO-Box 17-01-2759 - Quito-Ecuador	CÓDIGO: F-P-T-7.7-01-04	
		FECHA DE VIGENCIA: 12-12-2019	
ISO/IEC 17025		VERSIÓN: 02	

	K	76.52	mg/ L muestra	AOAC Official Method 977.29 Calcium, Potassium, and Sodium in electrolyte replenishers.
	Na	3.69	mg/ L muestra	AOAC Official Method 977.29 Calcium, Potassium, and sodium in electrolyte replen
	Zn	≤ LOC	mg/ L muestra	AOAC Official Method 971.20 Cooper and Nickel in Tea: Atomic Absorption Spectrometric Method

COMENTARIOS:

El cliente solicita se entregue la siguiente información:

1.- Límites de detección y cuantificación

Analito	Límite de detección (mg/L) LOD	Límite de cuantificación (mg/L) LOC	Rango de trabajo (mg/L)
Calcio	0.918	0.925	0.925-6.0
Cobre	0.524	0.543	0.543-5.0
Hierro	0.608	0.625	0.625-6.0
Magnesio	0.045	0.046	0.046-0.30
Potasio	0.530	0.543	0.543-4.5
Sodio	1.018	1.032	1.032-4.5
Zinc	0.100	0.102	0.102-1.0

Los Límites de detección se determinó siguiendo la metodología sugerida en la Eurachem.

2.- Equipo empleado: Perkin Elmer PinAAcle 900T

3.- Los métodos empleados son siguiendo la Normativa AOAC.

Realizado por:

Ing. Silvia Oleas
Analista DECAB

Revisado por:


 Responsable de Calidad DECAB

NOTAS:

- El cliente no ha solicitado una declaratoria de conformidad, en caso de que estos datos sean requeridos para comparar con alguna norma, ley o reglamento, el cliente debe solicitar al laboratorio la regla de decisión.
- El cliente puede canalizar las quejas sobre los resultados de los análisis, sobre el tiempo de entrega del informe, u otro aspecto, a través del Jefe del DECAB, o de la persona Encargada de Recepción de Muestra y Atención al Cliente, ya sea en forma verbal o en forma escrita hasta 8 días después de la entrega del informe. En el DECAB se mantiene un registro de quejas y sugerencias con el fin de mejorar el Servicio al Cliente.
- El laboratorio no se responsabiliza por el muestreo realizado antes de la entrega de las muestras al DECAB, pero si se responsabiliza de las muestras recibidas, tal como se la recibe.
- Los resultados reportados en este informe son únicamente referentes al ítem ensayado.

INFORME No: IE-AAS-22-002
Página 2 de 2

Fuente: DECAB, 2022.

**ANEXO E: DATOS DEL ANÁLISIS DE ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA PARA
Chlorella sp. DE LOS ENSAYOS RK Y RL.**

Los resultados de los análisis FTIR realizados para cada ensayo RK1-RK9, RL1-RL4 y RLaire utilizando fase acuosa HTC de pergamino de café y, activador para el cultivo de *Chlorella sp.* se resume en la siguiente tabla:

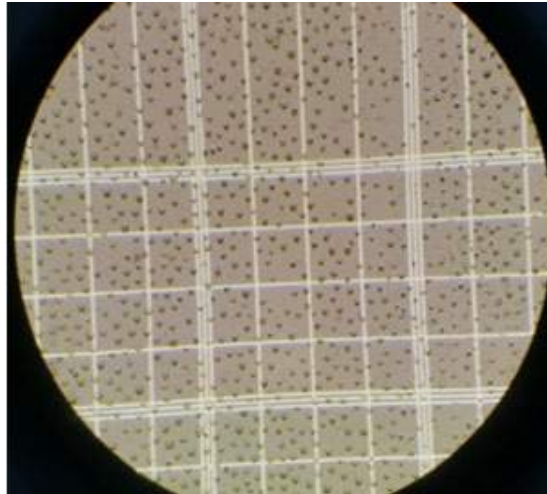
Número de onda [cm ⁻¹] RK1	Transmitancia [%]	Número de onda [cm ⁻¹] RK2	Transmitancia [%]	Número de onda [cm ⁻¹] RK3	Transmitancia [%]
3340.1	67.0393	3409.53	72.7866	3374.82	70.1463
2927.41	71.6999	3289.96	71.1889	3282.25	69.2266
2857.99	79.3409	2927.41	73.5861	2927.41	74.1082
2348.87	93.1178	2857.99	80.847	2857.99	81.8819
1743.33	92.0335	2348.87	92.7303	2352.73	94.4465
1639.20	82.9452	1743.33	93.1065	1743.33	93.0967
1554.34	89.8791	1639.2	86.4205	1639.2	85.8823
1380.78	90.9246	1554.34	91.8398	1380.78	92.7084
1241.93	91.3751	1407.78	92.3053	1245.79	92.3128
1045.23	80.4442	1245.79	93.9535	1045.23	83.1538
655.679	91.7946	1045.23	82.7417	586.254	91.9319
605.539	90.2037	601.682	91.9498		
536.114	88.0008				
Número de onda [cm ⁻¹] RK4	Transmitancia [%]	Número de onda [cm ⁻¹] RK5	Transmitancia [%]	Número de onda [cm ⁻¹] RK6	Transmitancia [%]
3286.11	53.9657	3374.82	81.5706	3355.53	73.499
2927.41	64.1706	3282.25	81.0226	3266.82	73.7634
2857.99	74.3428	2923.56	87.3905	2923.56	61.6104
1743.33	92.2187	2850.27	89.5035	2854.13	73.6955
1643.05	75.0722	1727.91	96.4145	1743.33	83.6521
1546.63	84.5256	1639.2	88.8151	1639.2	89.0199
1407.78	86.5928	1546.63	93.2658	1450.21	89.1122
1245.79	89.319	1407.78	94.1991	1411.64	88.7043
1041.37	71.7576	1238.08	94.4256	1265.07	91.865
551.542	86.8858	1045.23	87.746	1045.23	82.4069
				686.534	95.4315
Número de onda [cm ⁻¹] RK7	Transmitancia [%]	Número de onda [cm ⁻¹] RK8	Transmitancia [%]	Número de onda [cm ⁻¹] RK9	Transmitancia [%]
3440.39	83.0348	3421.1	84.7615	3297.68	71.5765
3309.25	81.476	3355.53	82.7088	2923.56	63.0635
3012.27	85.0068	3270.68	82.948	2854.13	74.1795

2923.56	62.1537	3008.41	86.001	1743.33	85.7516
2854.13	74.1227	2923.56	63.6009	1643.05	87.1777
1743.33	81.0622	2854.13	75.8012	1407.78	87.2168
1643.05	92.8329	1747.19	81.4592	1249.65	90.6939
1457.92	91.4588	1639.2	93.4546	1037.52	76.1504
1380.78	92.3327	1457.92	92.1809	539.971	88.4785
1245.79	92.7773	1241.93	93.1525		
1157.08	88.9271	1157.08	89.6083		
1045.23	85.8132	1041.37	87.246		
709.676	96.0291	601.682	95.2107		
590.111	95.3506				
532.257	95.0025				
Número de onda [cm ⁻¹] RL1	Transmitancia [%]	Número de onda [cm ⁻¹] RL2	Transmitancia [%]	Número de onda [cm ⁻¹] RL3	Transmitancia [%]
3278.39	64.0345	3559.95	91.6447	3401.82	90.3739
2923.56	70.6205	3517.52	91.1477	3305.39	90.3766
2857.99	78.9588	3440.39	89.3317	3008.41	92.7478
1743.33	92.289	3394.1	90.2312	2927.41	85.404
1643.05	83.2696	3313.11	90.543	2857.99	90.2695
1546.63	90.8664	3208.97	91.8237	1747.19	91.3181
1411.64	89.065	3008.41	91.0288	1639.2	95.2627
1253.5	89.916	2927.41	77.6515	1457.92	94.2312
1037.52	75.9206	2857.99	85.1412	1160.94	89.9404
640.251	91.271	1747.19	86.7851	732.817	96.6301
578.54	88.9831	1654.62	95.0933	593.968	96.2907
		1457.92	93.3793		
		1164.79	90.7639		
		698.105	95.475		
		644.108	96.1212		
Número de onda [cm ⁻¹] RL4	Transmitancia [%]	Número de onda [cm ⁻¹] RL aire	Transmitancia [%]		
3359.39	91.0385	3367.1	91.3564		
3309.25	90.7914	3297.68	91.556		
3012.27	92.7226	2923.56	88.5582		
2927.41	86.4428	2854.13	92.0521		
2857.99	90.9874	1743.33	94.7291		
1747.19	92.5578	1635.34	96.251		
1631.48	95.8501	1558.2	96.9329		
1457.92	95.0518	1454.06	96.3867		
1157.08	90.812	1411.64	96.4669		
1045.23	94.0073	1245.79	96.7729		

682.677	97.165	1153.22	95.6815	
590.111	96.0613	1049.09	93.8684	
536.114	96.7633	686.534	97.7123	
		640.251	97.8122	
		582.397	96.6141	

Realizado por: Andrade, M.; Bayas, D., 2022.

ANEXO F: PANORAMA DE *Chlorella sp.* EN EL MICROSCOPIO.



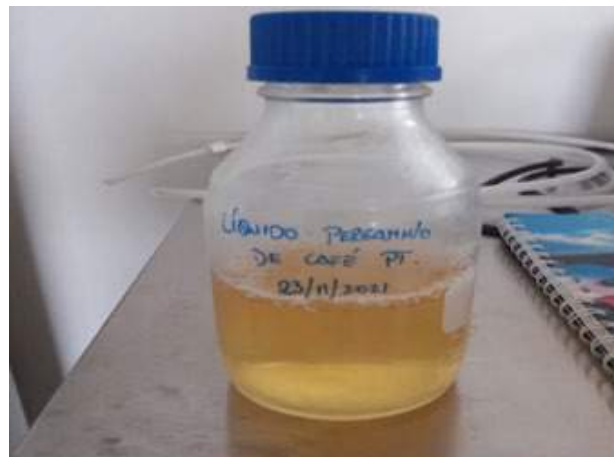
ANEXO G: OBTENCIÓN DE LA BIOMASA SECA MICROAGAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.



ANEXO H: PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES SERIALES CON *Chlorella sp.*



ANEXO I: FASE ACUOSA HTC DE PERGAMINO DE CAFÉ.



ANEXO J: PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL INÓCULO INICIAL.



ANEXO K: INSTALACIÓN DE CULTIVOS POR LOTES DE *Chlorella sp.*



ANEXO L: TOMA DE MUESTRA MICROALGAL DIARIA PARA LA LECTURA DE DENSIDAD ÓPTICA.



ANEXO M: CONTROL DE CINÉTICA CELULAR DE LOS CULTIVOS POR LOTES.



ANEXO N: USO DE LA CETRÍFUGA PARA LA COSECHA MICROALGAL.



ANEXO O: INSTALACIÓN DE LOS CULTIVOS DE *Chlorella sp.* PARA ESTUDIAR LA BIOFIJACIÓN DE CO₂.



ANEXO P: COSECHA DE LA MICROALGA *Chlorella sp.* DESPUÉS DE SU CENTRIFUGACIÓN.



ANEXO Q: MUESTRAS DEL PERGAMINO DE CAFÉ Y LA BIOMASA SECA DE *Chlorella sp.* PARA EL ANÁLISIS ELEMENTAL.



ANEXO R: AVAL DE LA INVESTIGACIÓN.



Instituto de Investigación
Geológico y Energético

Oficio Nro. IIGE-IIGE-2021-1111-O
Quito, D.M., 16 de noviembre de 2021

Asunto: Respuesta a solicitud de testista

Señora Doctora
Magdy Mileni Echeverría Guadalupe
Representante Docente Cogobierno
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
En su Despacho

De mi consideración:

Con un cordial saludo, en respuesta a oficio S/N del 12 de noviembre de 2021, mediante se solicita la vinculación como testistas dentro de la Línea de Investigación de Biomasa del IIGE, a: Andrade Guerrero Mayra Silvana y Bayas Moposita Daisy Nataly con el **Título de la tesis:** Influencia de la fase acuosa de la carbonización hidrotermal en la fijación de CO₂ por microalgas. (Tentativo).

Al respecto me permito indicar que la misma fue aceptada, los investigadores que acompañarán las actividades de las estudiantes son Mgs. Paola Cují y Quim. Carlos Méndez (correo electrónico: paola.cuji@geoenergia.gob.ec y carlos.mendez@geoenergia.gob.ec), con quienes deberán contactarse para coordinar las actividades de investigación y medidas de seguridad a tomar en cuenta para el ingreso al laboratorio.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Mgs. Martín Córdova Dummer
DIRECTOR EJECUTIVO

Referencias:
- IIGE-DAF-2021-0409-E

Copia:
Señor Magister
Vicente Sebastián Espinoza Echeverría
Subdirector Técnico, Subrogante



Instituto de Investigación
Geológico y Energético

Oficio Nro. IIGE-IIGE-2021-1111-O
Quito, D.M., 16 de noviembre de 2021

Señoría Doctora
Gina Soledad Lobato Cordero
Directora de Gestión Científica
Señora Magister
Paola Alexandra Cují Alegria
Líder IIG-Estudio Captura de Carbono
Señor
Carlos Alberto Méndez Durazo
Técnico 2
Señora Tecnóloga
Soledad Nancy López Pazmiño
Secretaría de Dirección

pa@iigec



ANEXO S: CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE NORMATIVA.



UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 08 / 07 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Daysí Nataly Bayas Moposita Mayra Silvana Andrade Guerrero
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Química
Título a optar: Química
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.

1444-DBRA-UTP-2022