

## Obtención de azúcares reductores por hidrólisis ácida a partir de un consorcio de microalgas amazónicas cultivadas en agua residual

### Obtaining reducing sugars by acid hydrolysis from a consortium of amazon microalgae cultivated in wastewater

Jorge Antonio Suárez Rumiche<sup>1\*</sup>; Ancelmo Castillo Valdiviezo<sup>2</sup>; Rosa Isabel Souza Najar<sup>1</sup>;

<sup>1</sup> Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Av. Freyre N° 616, Iquitos, Perú.

<sup>2</sup> Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n - Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

\* Autor correspondiente: [jsuarez\\_8812@hotmail.com](mailto:jsuarez_8812@hotmail.com) (J. Suarez)

DOI: [10.17268/rev.cyt.2021.04.03](https://doi.org/10.17268/rev.cyt.2021.04.03)

#### RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo obtener azúcares reductores a partir de un consorcio de microalgas amazónicas, cultivadas en agua residual. El consorcio de microalgas fue cultivado en agua residual durante 30 días, en fotobiorreactor cerrado de 7 L de capacidad a temperatura de ambiente, iluminación tipo Led 2x36 watt, fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad y agitación-aireación, midiendo la concentración de la biomasa por densidad óptica a 680 nm cada tres días, cosechada por decantación – centrifugación, para obtener una biomasa total de 25,2 gr. La ruptura celular de la biomasa seca de las microalgas se realizó por hidrólisis ácida a 2, 4 y 6 % de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), autoclavado a 120 °C durante 30, 60 y 90 min, el contenido de azúcares reductores en los diferentes tratamientos se realizó mediante el método del reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 540 nm, obteniendo el mejor rendimiento en azúcares reductores (1,406mg/L) para una hidrólisis del 6% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y tiempo de 90 minutos. Las microalgas cultivadas en agua residual, como materia prima se perfilan como la fuente más adecuada debido a su rápido crecimiento y alto contenido de azúcares reductores.

**Palabras Claves:** Consorcio; microalgas; biomasa; hidrólisis ácida; azúcares reductores

#### ABSTRACT

The objective of this research was to obtain reducing sugars from a consortium of Amazonian microalgae, grown in wastewater. The microalgae consortium was cultivated in wastewater for 30 days, in a closed photobioreactor of 7 L capacity at room temperature, 2x36 watt Led lighting, 12-hour light / dark photoperiod and stirring-aeration, measuring the biomass concentration, by optical density at 680 nm every three days, harvested by decantation - centrifugation, to obtain a total biomass of 25.2 gr. The cellular rupture of the dry biomass of the microalgae was carried out by acid hydrolysis at 2, 4 and 6% of sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), autoclaved at 120 °C for 30, 60 and 90 min, the content of reducing sugars in the different Treatments were carried out using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent method at 540 nm, obtaining the best yield in reducing sugars (1,406mg / L) for a hydrolysis of 6% of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and a time of 90 minutes. Microalgae grown in wastewater, as raw material, are emerging as the most suitable source due to their rapid growth and high content of reducing sugars.

**Key Words:** Consortium; microalgae; biomass; acid hydrolysis; reducing sugars

#### 1. INTRODUCCIÓN

Los combustibles de origen fósil representan la mayor parte de las emisiones mundiales de gases de efecto invernadero (GEI) de origen antropogénico, por lo que las energías renovables representan un potencial para mitigar el cambio climático y aportar otros beneficios. A nivel mundial, se estima que las energías renovables representan un 12,9%. (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, 2011)

Los biocombustibles son sustancias derivadas de biomasa o materia orgánica. A diferencia de los combustibles como el petróleo, carbón o gas natural que provienen de energía almacenada durante largos períodos en los restos fósiles, los biocombustibles se obtienen de una fuente de energía renovable y su producción es mucho más rápida. (Romanelli, *et al* 2016). La biomasa, es un conjunto de materia biológicamente renovable, de la cual se puede obtener bioetanol o el biodiesel de plantas o microalgas, por lo que existe un gran interés por la producción de grandes volúmenes de estos como alternativa a los combustibles fósiles. (Fernandez, *et al*, 2012)

Se denomina bioetanol al obtenido a partir de fuentes de biomasa vegetal; mieles y jugos ricos en sacarosa de fábricas azucareras, productos ricos en almidón y a partir de materiales lignocelulósicos. (Abril y Navarro, 2012).

Estudios recientes han demostrado que algunas especies microbianas, tales como levaduras, mohos y microalgas pueden ser usadas como materias primas potenciales para la producción de biodiesel y bioetanol, debido a la capacidad de almacenar grandes cantidades de lípidos y carbohidratos de la biomasa microalgal. (Gerhardt, F. *et al*, 2016). Las microalgas representan una importante alternativa para la generación de energía, además de proporcionar mayor independencia de las fuentes de combustibles fósiles utilizadas actualmente, a ejemplo del petróleo, disminuyen los impactos del medio ambiente reduciendo los niveles de contaminación. (Ortenzio *et al*, 2015). Además, poseen una capacidad fitorremediadora que consiste en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio líquido o gaseoso. Estos compuestos contaminantes son captados por la biomasa algal y pueden ser recuperados mediante su cosecha. Esta capacidad resulta en un sistema de cultivo con dos propósitos: eliminación de contaminantes y producción de biomasa que será transformado hasta obtener bioetanol. (Hernández y Labbé, 2014). Disponibilidad de nutrientes, intensidad de luz, temperatura y el pH son los factores más influyentes en la composición de la biomasa de microalgas. (Martín *et al*, 2019).

Las microalgas, mediante su metabolismo fotosintético, captan la luz, fijan dióxido de carbono y necesitan nutrientes del medio para generar biomasa, dentro de los requerimientos químicos necesarios para un buen crecimiento de las microalgas, se necesitan nutrientes como el carbono, nitrógeno y fósforo. (Dávila, 2016), siendo el nitrógeno el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Hernández y Labbé, 2014)

El cultivo de microalgas en estanques abiertos y/o canales de crianza es una práctica bien desarrollada, pero sólo pocas especies pueden desarrollarse, ya que se requiere de sustancias altamente alcalinas o selectos ambientes salinos. Sin embargo, cuando se utilizan fotobiorreactores completamente cerrados, se tienen mayores oportunidades de cultivos ya que éstos permiten una óptima fijación y captación de  $\text{CO}_2$  y crecimiento y desarrollo controlado, además de tener mayor asepsia que evita la infiltración de otros microorganismos que compiten por el medio. (Ramírez, 2017).

Los métodos utilizados tradicionalmente para la recolección de microalgas incluyen sedimentación gravimétrica, centrifugación, floculación, filtración y flotación. La sedimentación, o gravitación, es la concentración de biomasa simplemente depositando las células. La recuperación de biomasa por centrifugación es rápida, pero requiere mucho consumo de energía, lo que resulta en un aumento de los costos. Uno de los métodos que ha ganado mucho interés es la concentración de coagulación / floculación, ya que permite recuperar biomasa con menores costos económicos en comparación con la centrifugación. (Miranda, *et al*, 2012).

Hay varios pasos de procesamiento involucrados en la producción de bioetanol a partir de biomasa, incluido el pretratamiento, la sacarificación y la fermentación. El principal desafío en la producción de bioetanol a partir de biomasa de microalgas es liberar eficientemente azúcares fermentables de las células de microalgas. (Kyoung K. *et al*, 2014).

Se ha identificado en el río Itaya (Iquitos) varias especies de microalgas que son potencialmente buenas productoras de aceites y por lo tanto promisorias para la producción de biodiesel. Asimismo, las tres especies de microalgas oleaginosas aisladas muestran diferencias en sus perfiles de crecimiento, en la cantidad de biomasa y en la cantidad y tipos de lípidos totales. (Cobos, 2012)

La nueva demanda energética para abastecer a la población mundial requiere combinar la necesaria reducción del dispendio energético con el aumento decidido de energías renovables, en la región amazónica se aisló e identificó microalgas oleaginosas con fines de ser usadas como biodiesel, por el cual se viene investigando la manera de aprovechar la biomasa microalgal, caracterizar y cuantificar los carbohidratos, para luego transformarla hasta bioetanol.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Objeto de estudio

Para el desarrollo del presente estudio se empleó un consorcio de microalgas presentes en la cuenca hidrográfica de la amazonia peruana, representada por un consorcio de micro algas, proporcionados por el Banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP).

## 2.2 Métodos y Técnicas

### Caracterización del agua residual

Para el cultivo de microalgas se utilizó agua residual doméstica proveniente del colector de la av. Abelardo Quiñones con San Lorenzo - distrito de San Juan Bautista. Antes de su uso se filtró utilizando un filtro Wathman 40. Se realizó el análisis químico del agua residual doméstica.

Los parámetros y métodos analíticos utilizados para la determinación de las propiedades fisicoquímicas del agua residual se detallan en la tabla 1.

### Adaptación de las cepas microalgal en agua residual doméstica

El consorcio de las microalgas (cepas) seleccionadas para el estudio se adquirió en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP), debidamente certificadas. El cultivo puro se adaptó para su crecimiento en agua residual realizando diversos cultivos en biorreactores empleando agua residual colectadas en el alcantarillado ubicado en la intersección de la calle San Lorenzo y la av. Quiñones – Iquitos. La adaptación consistió en ir agregando semanalmente agua residual en una proporción inóculo/agua residual respectivamente, con iluminación natural y agitación manual esporádica en tubos de ensayo. Luego de la adaptación de las microalgas en agua residual, los cultivos fueron escalados progresivamente hasta alcanzar un volumen de 7 L. Los cultivos fueron mantenidos con agitación e iluminación artificial mediante 2 lámparas LED de 24 watts y una luminosidad de 2000 lúmenes con un periodo de iluminación de 12 horas de luz y 12 horas en la oscuridad. Las microalgas son microorganismos presentan rápido crecimiento en ambientes acuáticos controlado por una variedad de factores ambientales y, para su cultivo, son necesarias condiciones adecuadas de nutrientes, temperatura, pH e iluminación. (Ramos y Pizarro, 2018).

### Determinación del crecimiento microalgal

El crecimiento de micro algas se midió usando la técnica de la densidad óptica (absorbancia) a 680 nm con ayuda de un espectrofotómetro (Thermo Scientific modelo Nanodrop 2000) y mediante gravimetría por el contenido de sólidos suspendidos totales (SST).

### Cosecha de la biomasa

La cosecha se realizó en una primera etapa por gravedad (precipitación), se eliminó el sobrenadante, y la segunda etapa se centrifugó a 4 500 rpm por 10 minutos. La biomasa recuperada se secó a 50°C, para posterior análisis.

### Hidrólisis ácida de la biomasa microalgal

La hidrólisis ácida permitió la determinación de la concentración total de azúcares, en un tubo de ensayo se colocó 0,5 g de biomasa seca (o una cantidad equivalente de biomasa húmeda), se añadió 5 ml de ácido sulfúrico al 72% (m.m<sup>-1</sup>). Luego se colocó en un baño termostático a 30 °C durante 1 h. El contenido del tubo transfirió a un matraz de tapón de 250 ml y se añadió agua destilada, hasta que el ácido sulfúrico adquirió concentraciones finales de 2, 4 y 6% (m.m<sup>-1</sup>). El vial correctamente cerrado, se esterilizó en autoclave durante un tiempo de hidrólisis de 15, 30 y 60 min, la biomasa y temperatura fueron constantes de 0,5 g y 120 °C, la variable de respuesta será el contenido de azúcares reductores. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada biomasa de microalgas cosechadas. Se utilizó un diseño experimental de dos factores, el primer factor el ácido sulfúrico con tres niveles de concentración (2, 4 y 6% m.m<sup>-1</sup>) y el segundo factor fue el tiempo de hidrolisis con tres niveles (15, 30 y 60 min). La biomasa microalgal y la temperatura por medio de autoclave son constantes.

### Determinación de azúcares reductores por el método del DNS (Miller, 1959).

Los azúcares reductores son carbohidratos que contienen grupos aldehído y cetona que bajo condiciones alcalinas pueden reducir iones metálicos. Se utiliza el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), cuando este se calienta junto con azúcares reductores como la glucosa, fructuosa y galactosa, reduce el DNS al ácido 3-amino,5-nitrosalicílico. El producto resultante tiene un color naranja-rojo, esta coloración es proporcional a la cantidad de azúcares que contenga la solución, se puede usar esta característica para medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características del agua residual se muestran en la Tabla 1. Las aguas residuales poseen elevadas cantidades de nutrientes y materia orgánica que deben ser disminuidas hasta niveles satisfactorios, muchas de estas aguas residuales son vertidas a fuentes naturales generando impactos ambientales negativos.

Tabla 1 Características del agua residual

Parámetros	Técnica y/o método	Agua filtrada
Nitrógeno total(mg/L)	Kjeldahl (APHA-AWWA)	40,30
NH <sub>4</sub> <sup>1+</sup> (mg/L)	Volumétrico – Titulación	20,40
NO <sub>3</sub> <sup>1-</sup> (mg/L)	Reducción de Cadmio	9,42
NO <sub>2</sub> <sup>1-</sup> (mg/L)	Espectrofotometría UV	5,04
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	Ácido ascórbico	7,20
DQO (mg/L O <sub>2</sub> )	Volumétrico – Titulación	18.30
Solidos Suspendidos (mg/L)	Gravimétrico	4,30
pH	Electrodo	6,80

#### Descripción de las especies

Las muestras biológicas empleada en este trabajo fue el consorcio constituidas por cinco especies de microalgas pertenecen al grupo de las algas verdes fotosintéticas, son unicelulares y cuyo inóculo se cultivó en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP) y observadas en microscopio de Luz invertida Marca Leica a 40x. Se identificaron 5 especies del consorcio *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Chlorella spp*, *Ankistrodesmus* y *Spirulina* predominando en mayor proporción las especies de *Scenedesmus*, *Desmodesmus* y *Chlorella spp*, estas especies de microalgas fueron identificado en el río Itaya (Iquitos) y que son potencialmente, buenas productoras de aceites y por lo tanto promisorias para la producción de biodiesel. (Cobos, 2012), También, sobresalen por producir lípidos y carbohidratos, por lo que son considerados como una excelente alternativa para la producción sustentable de biocombustibles (Angulo, 2017)

#### Cultivo del consorcio de microalgas

Las microalgas fueron cultivadas a nivel de laboratorio, en cuatro fotobiorreactores cerrados en botellones PET (polietilentereftalato) de 7 litros de capacidad, esterilizados. El procedimiento de inoculación consistió en llenar los fotobiorreactores con 4 L de agua residual filtrada y se añadió 11 gr de biomasa húmeda que consiste en el consorcio de microalgas por cada biorreactor. Seguidamente, se homogenizo cada uno de los reactores, y se acondiciono con control de temperatura, luminosidad y fotoperiodo para darle las condiciones necesarias para el crecimiento de las microalgas. Cuando se usan fotobiorreactores completamente cerrados, se tienen mayores oportunidades de cultivos ya que éstos permiten una óptima fijación y captación de CO<sub>2</sub> y crecimiento y desarrollo controlado. (Ramírez, 2017).

#### Evaluación del crecimiento microalgal

En la figura 1, se muestra el crecimiento del consorcio de microalgas cada tres días midiendo la concentración de la biomasa por densidad óptica a 680 nm en un Nanoespectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Nanodrop 2000. Se midió la absorbancia para una muestra de 2,5 µL. hasta 30 días. El consorcio de microalgas se adaptó a las aguas residuales como medio de cultivo, teniendo un crecimiento favorable observándose una dinámica de crecimiento propio de los cultivos de microorganismos dándose en las siguientes fases: 1) Fase de adaptación 2) fase exponencial 3) fase de declinación del crecimiento 4) fase estacionaria y 5) fase de muerte. (Mayorga y Manso, 2017) (Duarte, 2013). Las microalgas son microorganismos rápido crecimiento en ambientes acuáticos controlado por una variedad de factores ambientales y, para su cultivo, son necesarias condiciones adecuadas de nutrientes, temperatura, pH e iluminación. (Ramos y Pizarro, 2018).

#### Cosecha de la biomasa

La cosecha se realizó en una primera etapa por decantación eliminando el sobrenadante, y la segunda etapa se centrifugó a 4 500 rpm por 10 minutos. La biomasa recuperada se secó a 50°C, para posteriores análisis. Obteniéndose una biomasa total de 25,2 gr.

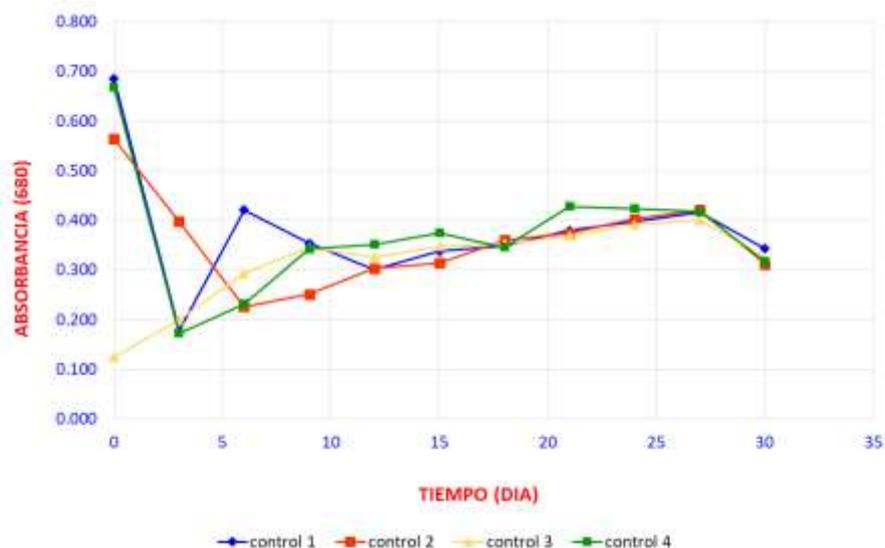


Figura 1. Crecimiento microalgal

### Hidrólisis ácida de la biomasa microalgal

#### Rotura celular de microalgas y producción de azúcares reductores.

Las pruebas de explosión se realizaron por triplicado con aproximadamente 0,5 g de biomasa seca, en ácido sulfúrico al 72 %, colocado en baño caliente a 30 °C durante una hora y agregando 283,5 ml, 139 ml y 90,75 ml de agua destilada para reducir a 2, 4 y 6 % de ácido sulfúrico, autoclavado a 120 °C durante 30, 60 y 90 min.

#### Determinación colorimétrica del contenido en azúcares reductores

El contenido de azúcar reductor se determinó mediante el método (DNS)

La determinación colorimétrica del contenido de azúcares reductores en microalgas se realizó mediante el método del reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959). La concentración de azúcares reductores en la muestra se obtuvo de una línea de calibración con concentraciones de glucosa entre 0,05 y 2,0 g.L<sup>-1</sup>. Para una biomasa seca hidrolizada que contiene monosacáridos reductores, el método de DNS muestra una buena sensibilidad con ajuste lineal en los rangos de concentración probados. (Miranda *et al*, 2012).

#### Obtención de Azúcares reductores a partir de la hidrólisis de biomasa seca de microalgas cultivadas en agua residual

Tabla 2. Promedio de rendimiento en azúcares reductores obtenidos en los ensayos

Ensayos	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Tiempo	Azúcares Reductores (g/L)			Promedio	DS
			1	2	3		
1	2	30	0,282	0,211	0,234	0,242	0,036
2	2	60	0,421	0,569	0,480	0,490	0,075
3	2	90	0,392	0,516	0,493	0,467	0,066
4	4	30	0,891	0,803	0,815	0,836	0,048
5	4	60	0,600	0,640	0,701	0,647	0,051
6	4	90	0,866	0,958	0,948	0,924	0,050
7	6	30	1,459	1,381	1,192	<b>1,344</b>	0,137
8	6	60	1,382	1,451	1,304	<b>1,379</b>	0,073
9	6	90	1,441	1,398	1,379	<b>1,406</b>	0,032

La Tabla 2 muestra los valores promedios en azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis ácida de la biomasa seca de microalgas cultivadas en laboratorio, para los diferentes ensayos realizados cuando se manipularon las variables de estudio, cantidad de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2, 4, y 6%) y tiempo de hidrólisis (30, 60, y 90 minuto), observándose

que la concentración de azúcares reductores en la hidrólisis se ve favorecida cuando la cantidad de ácido sulfúrico y tiempo de hidrólisis se incrementan. Obteniendo el mejor rendimiento en azúcares reductores (1,406 g/L) cuando la hidrólisis se realizó con una cantidad de 6% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y tiempo de 90 minutos, lo que demuestra que bajo estas condiciones se obtiene un buen rendimiento de azúcares reductores. La biomasa seca mostró resultados muy superiores a los obtenidos con biomasa húmeda para las mismas concentraciones de ácido. (De Farías y Bertucco, 2016). La cantidad de biomasa seca y los parámetros de hidrólisis son condiciones importantes para la extracción de azúcares reductores en microalgas de agua dulce, cultivadas en aguas residuales (Miranda *et al*, 2012)

#### Análisis de Varianza (ANOVA)

**Tabla 3.** Resultado del análisis de Varianza (ANOVA) del rendimiento de azúcares reductores vs. Ensayos

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Ensayos	8	4,57405	0,57176	117,45	0,000
Error	18	0,08762	0,00487		
Total	26	4,66167			

S = 0,06977 R-cuad. = 98,12% R-cuad. (ajustado) = 97,28%

P < nivel de significancia → Rechazar Ho ⇒ 0,000 < 0,05 Si → rechazamos Ho

La Tabla 3 muestra el análisis de varianza (ANOVA), realizado a los valores de azúcares reductores, obtenidos en los ensayos de hidrólisis ácida de la biomasa de microalgas, nos muestran un p = 0,000 esto nos indica que al menos uno de estos valores promedios observados en la Tabla 2 presenta diferencia estadística significativa con respecto a los demás valores, para un  $\alpha = 0,05$ .

**Tabla 4.** Prueba de Tukey de los azúcares reductores vs. Ensayos

Ensayos	N	Media	Agrupación		
9	3	1,4059	A		
8	3	1,3792	A		
7	3	1,3437	A		
6	3	0,9241	B		
4	3	0,8365	B	C	
5	3	0,6467		C	D
2	3	0,4899			D
3	3	0,4670			D
1	3	0,2423			E

La tabla 4, muestra la prueba de Tukey realizada a los resultados de azúcares reductores obtenidos en los diferentes ensayos de la hidrólisis ácida de la biomasa de micro algas, observándose que los valores medios obtenidos en los ensayos 7, 8 y 9 son los más elevados y que estos comparten una misma letra por lo que nos reconfirma que los valores medios de azúcares reductores obtenidos en estos ensayos no presentan diferencia estadística significativa.

#### 4. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación muestra a las microalgas cultivadas en agua residual, como materia prima para la producción de biocombustibles, por su adaptabilidad y crecimiento en aguas residuales, la obtención de y ruptura/hidrólisis de la biomasa del consorcio de microalgas con ácido sulfúrico al 2, 4 y 6 %, autoclavado a 120 ° C durante 30, 60 y 90 min., representa el método de disrupción celular más adecuado para obtener buenos rendimientos de azúcares reductores obtenidos en los diferentes ensayos, los valores más altos fueron de: 1,3437 mg/L, 1,3792 mg/L y 1,4059 mg/L de AR, cuando se trabajaron a % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y Tiempo de: 6%\*30min; 6% \*60 min y 6%\*90 min respectivamente, estos valores muestran una diferencia estadística con respecto a los demás ensayos como se observa en el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, además estos valores no presentaron diferencia estadística entre ellos por lo que se podría trabajar la hidrólisis en cualquiera de los tres parámetros usados en los ensayos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abril, A.; Navarro, E. 2012. Etanol a partir de Biomasa Lignocelulósica. Aleta Ediciones. Sevilla, España. 102 pp.
- Angulo L. 2017. Catálogo de genes del metabolismo de lípidos de microalgas oleaginosas amazónicas promisorias para la producción sustentable de biodiesel. Iquitos – 2016. Trabajo de fin de doctorado. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos-Perú.
- Cobos, M.; Castro, J.; Del Águila, J.; Soplín, H. 2012 Identificación de microalgas oleaginosas en el área de concesión para conservación, cuenca alta del Río Itaya. Loreto-Perú. Ciencia Amazónica (Iquitos), 2(2), pp. 162-168
- Dávila, B. 2016. Obtención de bioetanol a partir de biomasa cultivada em agua residual empleando ozoflotación como de cosecha. [http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/?func=service&doc\\_library=TES01&doc\\_number=000739746&line\\_number=0001&func\\_code=WEB-BRIEF&service\\_type=MEDIA](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/?func=service&doc_library=TES01&doc_number=000739746&line_number=0001&func_code=WEB-BRIEF&service_type=MEDIA)
- De Farías, C.; Bertucco, A. 2016. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. Process Biochemistry, 51(11), pp.1833-1842.
- Duarte, S. 2013. Estudo da produção de microalgas a partir de águas residuais. Tesis do grau de Mestre em Tecnologia Química. Instituto Politécnico de Tomar. Lisboa-Portugal
- Fernandez, L.; Montiel-Montoya, J.; Millán-Oropeza, A.; Badillo-Corona, J. 2012. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. Ra Ximhai, 8(3), pp. 101-115. Universidad Autónoma Indígena de México. El Fuerte, México
- Gerhardt, F.; Decesaro, A.; Berticelli, R.; Collao, L. 2016. Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: Uma Revisão Bioethanol Production Using Microalgae: Uma Revisão. Semina: Ciências Exatas E Tecnológicas, 37(1), pp. 159-174.
- Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. 2011. Fuentes de energía renovables y mitigación del cambio climático. [https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/srren\\_report\\_es-1.pdf](https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/srren_report_es-1.pdf)
- Hernández, A.; Labbé, J. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista De Biología Marina Y Oceanografía, 49(2), pp. 157-173.
- Kyoung, K.; In, Ch.; Ho, K.; Seung, W.; Hyeun-Jong, B. 2014. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. Bioresource Technology, February 2014, 153, pp.47-54
- Mayorga, C.; Manso, L. 2017. Crecimiento de la microalga *Dunaliella salina* en un cultivador Raceway en condiciones de laboratorio. Revista De Iniciación Científica, 3(1), pp. 85 – 91
- Martín, J.; Vega, M.; Riol, E.; Muñoz, J. y Bolado, S. 2019. Optimisation of the production of fermentable monosaccharides from algal biomass grown in photobioreactors treating wastewater. Bioresource Technology 281, 239–249.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31(3), pp. 426–428.
- Miranda, J.; Passarinho, P.; Gouveia, L. 2012. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 2012 -01. Vol. 104, 342-348.
- Ortenzio, Y.; Amaral, G.; Almeida, S.; Oliveira, E. 2015. Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. Bioenergia em revista. 5 (1), pp. 58-65.
- Ramírez, J. 2017. Viabilidad en la producción de biomasa microalgal a partir de fotobioreactores solares en el Valle del Cauca, Colombia. *RIAA*, 8(2), pp. 127-140.
- Ramos, R.; Pizarro, R. 2018. Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (*Perciformes: Carangidae*). Revista de biología marina y oceanografía. 53 (1) pp. 75-86.
- Romanelli, G.; Ruiz, D.; Pasquale, G. 2016. Química de la biomasa y los biocombustibles. Editorial de la Universidad de la Plata. Buenos Aires. Argentina. pp. 113.

