



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

PRODUCCIÓN DE BIOTURBOSINA A PARTIR DE LÍPIDOS
DE *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing MEDIANTE
HIDRODESOXIGENACIÓN

Proyecto que presenta

B.M. JOCSAN AXEL FALCÓN-VALDÉS

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán. Abril 2019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a los dos seres humanos más hermosos y leales que conozco, Alicia y Guadalupe. Gracias por enseñarme que las cosas sí las haces con amor, pasión y dedicación la vida te sonríe. Son un ejemplo de vida, ¡Las amo!

AGRADECIMIENTOS

A mi director el Dr. Luis Felipe Barahona Pérez por su confianza y orientación en el presente trabajo de tesis, así como el apoyo y tiempo en las revisiones de la información lograda en esta tesis.

A mi comité de tesis el Dr. Juan Carlos Chavarría por los consejos, correcciones y el apoyo con el reactor de lecho fijo, y a la Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega por su revisión crítica y acertada durante el desarrollo del trabajo.

A mis revisores de tesis la Dra. Virginia Herrera Valencia y la Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez por los consejos, observaciones y críticas durante el proceso de revisión del documento.

Al técnico M. en C. Bartolomé Humberto Chi Manzanero por la asistencia en la cosecha de la biomasa microalgal de fotobiorreactores en columna.

A la técnico I.Q. Tanit Toledano Thompson por el apoyo en la realización de los análisis de Microscopia Electrónica de Barrido y Espectroscopía de Energía Dispersiva, así como su guía en Cromatografía de Capa Fina y de Columna.

Al M. en C. Jorge Domínguez Maldonado, por la ayuda con los análisis de espectroscopía infrarroja.

A la M. en C. Marisol Castro por la asistencia en la síntesis del catalizador.

Al M. en C. Martín Baas López por la asistencia en los análisis de Fisisorción de N para el catalizador utilizado.

Al técnico M. en C. José Pablo Rodríguez López y M. en C. Anel Ivon Castillo Escobedo por la supervisión y guía en la realización de los ensayos catalíticos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico extendido para la realización de este proyecto de tesis mediante la beca de maestría No.236222 en apoyo a la manutención y estancia en Mérida

Al fondo ASA-CONACyT y al proyecto “Aprovechamiento de terpenos producidos por microalgas para la producción de bio-keroseno parafínico sintetizado” con clave 243145; por financiar el presente proyecto de tesis.

Al Proyecto de CONACyT 253986, por el equipamiento para realizar los análisis de FT-IR.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por la oportunidad de realizar esta tesis de maestría; y a la Unidad de Energía Renovable por formación académica, así como las facilidades materiales y técnicas para la culminación del presente proyecto de investigación.

Agradezco a mi familia, mis padres José Juan y Ana Luisa que con su ejemplo y modelo han estado siempre presentes. A mis hermanas Zaira, Lizbeth y Joanna, un puñado de personalidades invaluable y extraordinarias a su singular manera.

Agradezco de igual manera a mis amigos Mayra, Carlos, Alex, Nacho, Paco por las comidas, los ánimos, las risas, los jalones de oreja y el apoyo. A Giuliana, Marilem y Marcos por su tiempo, palabras y empuje moral cuando más lo necesité.

De igual forma agradezco a toda persona que me haya brindado su tiempo, apoyo, consejo u observación, prácticamente recibí ayuda de todos los departamentos en CICY.

Y agradezco a Lupita, por ser parte importante de esta etapa.

INDICE

INDICE	i
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 1 ANTECEDENTES	3
1.1. Microalgas	3
1.2. <i>Scenedesmus</i> sp.	4
1.3. Sistemas de producción microalgal	5
1.3.1. Medios de cultivo	6
1.3.2. Importancia biotecnológica.....	8
1.3.3. Microalgas como materia prima de lípidos	8
1.3.4. Lípidos microalgales y su potencial para biocombustibles.....	9
1.4. Bioenergéticos a partir de microalgas.....	10
1.5. Biocombustibles	10
1.5.1. Generaciones de biocombustibles	11
1.6. Combustibles de aviación.....	12
1.6.1. Bioturbosina	13
1.6.2. Síntesis de bioturbosina	14
1.6.2.1. Proceso Fischer-Tropsch.....	14
1.6.2.2. Proceso SIP.....	15
1.6.2.3. Proceso ATJ.....	15
1.6.2.4. Proceso HEFA.....	15
1.7. Hidrotratamiento de aceites	16
1.7.1. Catalizadores para HDO	18
1.7.2. Soportes	18
1.7.3. Zeolita	19
1.7.4. ZSM22	20

JUSTIFICACIÓN.....	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
CAPITULO 2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
2.1. Diagrama experimental.....	23
2.2. Cepa <i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing	24
2.3. Medio y condiciones de cultivo	24
2.3.1. Medio TAP	24
2.3.2. Medio ARS.....	25
2.4. Curva de crecimiento.....	26
2.4.1. Recuento celular	26
2.5. Cultivo de biomasa microalgal	27
2.5.1. Material (Esterilizado).....	27
2.6. Purificación de la cepa SC01	27
2.6.1. Lavados con HCl.....	27
2.6.2. Crecimiento en placas de Petri.....	28
2.7. Sistemas de cultivo y escalamiento	28
2.7.1. Matraces 50 mL	28
2.7.2. Matraces Celstir 500 mL	28
2.7.3. Fotobiorreactor (FBR) de 3 L.....	29
2.7.4. Fotobiorreactor (FBR) de 20L.....	29
2.8. Cosecha de biomasa.....	29
2.9. Extracción de lípidos.....	30
2.9.1. Método con maceración	30
2.9.2. Método con ultrasonido.....	31
2.10. Cromatografía de capa fina (CCF).....	32
2.11. Cromatografía de columna por gravedad.....	32
2.12. Transesterificación	34

2.13. Cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-EM)	34
2.14. Síntesis del soporte catalítico ZSM-22- γ -Al ₂ O ₃	34
2.15. Impregnación de platino en ZSM-22- γ -Al ₂ O ₃	35
2.16. Caracterización del catalizador	36
2.16.1. Microscopía electrónica de barrido.....	36
2.16.2. Difracción de rayos X	37
2.16.3. Fisisorción de nitrógeno	37
2.17. Reacción de Hidrodesoxigenación.....	37
2.17.1. Parámetros de reacción	38
2.18. Reacciones.....	39
CAPITULO 3 PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL Y EXTRACCIÓN LIPÍDICA	40
3.1. Clasificación de <i>Scenedesmus obliquus</i>	40
3.2. Reacondicionamiento de la cepa en medio TAP.....	41
3.3. Cultivos en matraz Celstir de 500 mL en medio TAP.....	43
3.4. Cultivos en botellas PET de 3L.....	44
3.5. Cultivos en columnas de burbujeo de 20 L	49
3.6. Extracción de lípidos microalgales.....	50
3.7. Cromatografía de capa fina CCF de los extractos por macerado y ultrasonido	51
3.8. Cromatografía Flash de extracto por sonicado	53
3.9. Cromatografía de capa fina del extracto del fotobiorreactor de 20 L.....	54
3.9.1. Perfil de compuestos en extracto lipídico proveniente de FBR de 20 L.	56
3.9.1.1. Hidrocarburos.....	59
3.9.1.2. Triglicéridos	59
3.9.1.3. Ácidos y alcoholes grasos	60
3.9.1.4. Esteroles	61
3.9.1.5. Terpenos	62
3.9.1.6. Fosfolípidos	63

CAPITULO 4 CARACTERIZACIÓN DEL CATALIZADOR Y REACCION DE HIDRODESOXIGENACIÓN.....	65
4.1. Caracterización del catalizador.....	65
4.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido de Pt/ZSM-22- γ -Al ₂ O ₃	65
4.1.2. Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS)	66
4.1.3. Difracción de Rayos X (DRX).....	66
4.1.4. Fisisorción de Nitrógeno.....	68
4.2. Reacción de hidrodeseoxigenación	70
4.2.1. Estándares.....	70
4.2.1.1. Hidrodeseoxigenación de heptadecano	71
4.2.1.2. Hidrodeseoxigenación de colesterol	72
4.2.1.3. Hidrodeseoxigenación de triestearina	73
4.2.2. Productos de la reacción de hidrodeseoxigenación.....	75
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	82
BIBLIOGRAFIA	83
ANEXOS.....	92
A. Protocolo para la extracción de lípidos microalgales	92
B. Cromatografías de las fracciones del extracto microalgal	93
C. Hidrodeseoxigenación de estándares.....	103
D. Hidrodeseoxigenación de lípidos de <i>S. obliquus</i>	106

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Cultivos de <i>Scenedesmus</i> sp. para la producción de biocombustibles	5
Tabla 1.2. Clasificación de biocombustibles basado en la materia prima para su producción [9,52,57]	12
Tabla 1.3. Procesos de producción de bioturbosina aprobados por la ASTM [3].....	14
Tabla 2.1. Formulación del medio de cultivo TAP	25
Tabla 2.2. Formulación del medio de cultivo ARS.....	25
Tabla 2.3. Fases móviles de cromatografía en columna por gravedad	33
Tabla 2.4. Parámetros de activación y reacción.....	38
Tabla 3.1. Diferencias en peso de las metodologías de extracción	51
Tabla 3.2. Perfil de compuestos identificados en fracciones eluidas por cromatografía en columna.....	57
Tabla 3.3. Porcentajes de los grupos de lípidos en el extracto microalgal.....	58
Tabla 4.1. Caracterización del catalizador Pt/ZSM-22- γ -Al ₂ O ₃	70
Tabla 4.2. Productos de reacción de la HDO del heptadecano	71
Tabla 4.3. Productos de reacción de la HDO del colesterol	72
Tabla 4.4. Productos de reacción de la HDO de la triestearina	73
Tabla 4.5. Biocombustibles obtenidos de la HDO de la triestearina	74
Tabla 4.6. Productos de la reacción de hidrodeshidrogenación.....	75
Tabla 4.7. Variación del número de carbonos durante el proceso de HDO	76
Tabla 4.8. Variación de la estructura molecular durante el proceso de HDO	77
Tabla 4.9. Variación de la presencia de compuestos oxigenados en el proceso de HDO	78
Tabla 4.10. Variación de los compuestos insaturados después de la HDO.....	79

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Recursos, usos y productos de las microalgas	7
Figura 1.2. Bioenergéticos a partir de microalgas. Basado en [11].....	10
Figura 1.3. Reacciones estequiométricas en la conversión de hidrocarburos, basado en [66]	16
Figura 1.4. Estructura tridimensional de la zeolita ZSM-22 [70]	20
Figura 2.1. Diagrama experimental para la obtención de bioturbosina a partir de aceite de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	23
Figura 2.2. Cámara de Neubauer de 9 mm ²	26
Figura 2.3. Extracción de lípidos por maceración. A) Sedimentación y B) extracto recuperado	30
Figura 2.4. Sistema de cromatografía en columna. A) Muestra. B) Muestra en columna. C) Elución de los compuestos	33
Figura 2.5. Preparación del catalizador A) Impregnación del Pt en la zeolita y B) Calcinación	36
Figura 2.6. Diagrama del reactor de lecho fijo.....	38
Figura 3.1. Tratamiento ácido del cultivo de SCO1. Observación al microscopio a 40x antes (A) y después (B) del tratamiento.....	41
Figura 3.2. Cultivo en placa de agar de <i>Scenedesmus obliquus</i> posterior al tratamiento ácido.....	42
Figura 3.3. Cultivo en matraces de 150 mL de SCO1 después de la limpieza con HCl 1 N	42
Figura 3.4. Cultivo en celstir de 500 mL.....	43
Figura 3.5. Curva de crecimiento celular en matraz Celstir de 500 mL en medio TAP	43
Figura 3.6. Fotobiorreactores de 2L TAP (A) y ARS/melaza (B)	44
Figura 3.7. Curva de crecimiento celular en sistema FBR 2L con TAP. En azul la curva de pH.....	45
Figura 3.8. Curva de crecimiento celular en sistema FBR 2L con ARS/melaza. Concentración celular (●), pH (línea azul)	46
Figura 3.9. Curva de crecimiento celular en sistema FBR 2L con ARS/melaza-TRIS. En azul la curva de pH	47

Figura 3.10. Curva de crecimiento celular en sistema FBR 2L con medio ARS/acetato de amonio, en azul se presentan los cambios de pH en el cultivo	48
Figura 3.11. Curva de crecimiento celular en sistema FBR 20L con medio ARS/acetato de amonio, en azul se presentan los cambios de pH en el cultivo	49
Figura 3.12. A. Extractos lipídicos viales (A, B, C) maceración; tubos (1', 2', 3') ultrasonido. B. Separación de la fase acuosa y orgánica (cloroformo:lípidos)	50
Figura 3.13. CCF de los extractos obtenidos por sonicado (n'') y obtenidos por maceración (M)	52
Figura 3.14. Eluciones de la cromatografía en Isolera Prime de la muestra 2''	53
Figura 3.15. Cromatografía de capa fina de las fracciones del extracto microalgal clave 2'' obtenidas por cromatografía flash.....	54
Figura 3.16. Cromatografía de capa fina de las fracciones del extracto de la biomasa proveniente del fotobiorreactor de 20 L.....	55
Figura 3.17. Cromatografía de capa delgada de la reacción de transesterificación Ac) Referencia de triglicérido. μ) Extracto lipídico; F2) fracción 2; TF2) muestra transesterificada de la fracción 2	56
Figura 3.18. Principales ésteres metílicos del extracto lipídico de <i>S. obliquus</i>	60
Figura 3.19. Principales ácidos y alcoholes grasos del extracto lipídico de <i>S. obliquus</i> ...	60
Figura 3.20. Principales esteroides del extracto lipídico de <i>S. obliquus</i>	61
Figura 3.21. Principales terpenos en extracto lipídico de <i>S. obliquus</i>	62
Figura 3.22. Espectro FTIR de la fracción 9.....	63
Figura 4.1. Microfotografía de Pt/ZSM-22-γ-Al ₂ O ₃ . A) Agregados de γ-Al ₂ O ₃ . B) Partículas de γ-Al ₂ O ₃ cubiertas por cristales de ZSM-22)	65
Figura 4.2. Mapeo de Platino en la superficie del catalizador Pt/ZSM-22-γ-Al ₂ O ₃	66
Figura 4.3. Difractogramas de rayos X de la zeolita ZSM-22 y el catalizador Pt/ZSM-22-γ-Al ₂ O ₃	67
Figura 4.4. Difractograma de Pt/ZSM-22-γ-Al ₂ O ₃	68
Figura 4.5. Isotherma de adsorción-desorción del catalizador Pt/ZSM-22-γ-Al ₂ O ₃	69
Figura 4.6. Principales productos de reacción de la HDO del heptadecano	71
Figura 4.7. Principales productos de reacción de la HDO del colesterol	72
Figura 4.8. Principales productos de reacción de la HDO de la triestearina	74
Figura 4.9. Molécula de Farnesano, en azul señalados los carbonos terciarios	77

RESUMEN

El transporte aéreo contribuye al aumento de las concentraciones de gases de efecto invernadero en la atmósfera por lo que se ha propuesto el uso de biocombustibles como una alternativa renovable y sustentable que ayude a reducir la huella ecológica por el uso de la turbosina de origen fósil. Las microalgas, organismos fotosintéticos eficientes con altas tasas de crecimiento y productividad de biomasa, representan un recurso potencial para la producción renovable de biocombustibles aeronáuticos a partir de lípidos. En el presente proyecto se cultivó la microalga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing en fotobiorreactores de 20 L utilizando como medio agua residual sintética enriquecida con acetato de amonio como fuente de carbono y nitrógeno. Se obtuvieron concentraciones celulares de 23×10^6 cel mL⁻¹ lo que representó 0.394 g L⁻¹ de biomasa seca y 73 mg L⁻¹ de lípidos totales. Con los lípidos obtenidos, se realizó un proceso de hidrodeseoxigenación (HDO) catalítica en un reactor de lecho fijo, utilizando Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃ como catalizador. A partir de los compuestos obtenidos se pudo determinar que tuvieron lugar procesos de desoxigenación, isomerización, hidrogenación y ciclización. Tomando en cuenta el número de carbonos, el 45.5% de los compuestos resultantes pueden ser clasificados dentro del rango de la bioturbosina.

ABSTRACT

Air transport contributes to the increase of greenhouse gases concentrations in the atmosphere. The use of biofuels has been therefore proposed as a renewable and sustainable alternative that could help reduce the ecological footprint from the use of fossil fuel. Microalgae are efficient photosynthetic organisms with high growth rates and biomass productivity that show good potential as a source for the renewable production of aeronautical biofuels from lipids. In the present project, the microalga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing was cultivated in 20 L photobioreactors using synthetic wastewater enriched with ammonium acetate as a carbon and nitrogen source. Cell concentrations of 23×10^6 cel mL⁻¹ were obtained, which represented 0.394 g L⁻¹ of dry biomass and 73 mg L⁻¹ of total lipids. The microalgal lipids were subjected to a catalytic hydrodeoxygenation (HDO) process in a fixed bed reactor, using Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃ as a catalyst. Deoxygenation, isomerization, hydrogenation and cyclization processes took place during the HDO reaction according to the compounds obtained from the reactor. 45.5% of the compounds in the final reaction mixture can be considered within the range of biojet fuel.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las emisiones mundiales de gases de efecto invernadero (GEI) se han incrementado significativamente, lo cual ha generado diversos efectos negativos; entre ellos el cambio climático. Durante la última década, los efectos del cambio climático y la degradación ambiental se han intensificado y las reservas probadas de petróleo se encuentran a la baja. Esto, combinado con los problemas político/sociales en algunas regiones, podría generar inestabilidad en la seguridad energética de los países con fuentes de energía fósil escasas [1].

Una quinta parte de las emisiones de CO₂ son producidas por el sector transporte. Dentro de esta clasificación, el transporte terrestre es el primer generador de los gases de efecto invernadero; siendo el transporte aéreo el que sigue en importancia. El consumo mundial de turbosina es de 800 millones de litros por día y sigue en aumento, representando alrededor del 10% de la energía global empleada para el transporte [2].

En el caso del transporte terrestre ya existen fuentes de energía renovable alternativas al uso de combustibles fósiles. Pero el sector aeronáutico necesita de fuentes con alta densidad energética, por lo que el uso de biocombustibles es una opción viable.

En las últimas décadas se ha estudiado ampliamente la producción de biocombustibles a partir de la biomasa de cultivos energéticos. Actualmente existen numerosos trabajos que utilizan jatropha, higuera y palma aceitera como materia prima para la producción de biocombustibles. No obstante, el aceite y la biomasa basados en microalgas tienen varias ventajas y aplicaciones potenciales sobre los cultivos oleaginosos terrestres al ser organismos fotosintéticos eficientes con altas tasas de crecimiento y productividad de biomasa siendo hasta 12 veces mayor a las plantas terrestres. La concentración promedio de aceite en microalgas llega a ser entre 20 y 50% del total de la biomasa; por lo que se considera un recurso alternativo con potencial para la producción renovable de biocombustibles aeronáuticos (bioturbosina) [3].

Las microalgas son los principales productores primarios de oxígeno a nivel mundial, y conjuntamente su producción se acopla al secuestro del CO₂ atmosférico, siendo capaces de fijar hasta 2 kg de CO_{2-eq} por cada kilogramo de biomasa producida[4-6]. La producción y consumo de biocombustibles a partir de microalgas forma un ciclo de restitución de tasa

cero; ya que el carbono liberado en la quema del biocombustible previamente fue fijado en la generación de la biomasa, no incrementando los niveles de CO₂ en la atmósfera [[7]. De igual manera la implementación de este grupo de organismos en el tratamiento terciario de aguas residuales presenta grandes ventajas frente a los sistemas convencionales, no generando problemas de contaminación secundaria y maximizando la reducción de nutrientes u otros contaminantes [8].

En el presente trabajo se estudió la producción de biocombustible para la aviación a partir de biomasa de cultivos de *Scenedesmus obliquus* como alternativa a los combustibles de origen fósil. Para lograr este objetivo; se llevó a cabo la producción de biomasa microalgal en fotobiorreactores en columna de 20 litros en un medio de agua residual sintética; la valoración de un método de extracción de lípidos más adecuado para la biomasa generada, (que en un posible escenario industrial brindará bases para la reducción de costos y tiempos); y el análisis de la transformación de los lípidos microalgales a biocombustible mediante hidrodeshidrogenación en un reactor de lecho fijo utilizando el catalizador Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃.

CAPITULO 1 ANTECEDENTES

1.1. Microalgas

Las microalgas son un grupo filogenéticamente más diverso que las plantas terrestres, con más de 40 000 especies, de las cuales solamente 50 han sido estudiadas con detalle. Su diversidad filogenética y su capacidad de producción de compuestos bioquímicos demuestran que cuentan con una complejidad bioquímica excepcionalmente amplia, haciéndolas un grupo de estudio con gran potencial para la industria biotecnológica. Presentan una considerable gama de patrones lipídicos, los cuales generalmente se cree que son el resultado de la adaptación de las microalgas a las diversas condiciones ambientales, lo que las hace atractivas para su estudio como fuentes de biocombustibles como la bioturbosina [1] SEPÚLVEDA I. (2012) Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 579-594.

[2] WILHELM D. G., M. A. Mandegari, S. Farzad, J. F. Gorgens (2016) Techno-economic comparison of biojet fuel production from lignocellulose, vegetable oil and sugar cane juice. Bioresource Technology. 216, 331-339.

[3] AMEZCUA A.M.A., J.C. Gutiérrez V., J.A. Aburto Anell (2016) Combustibles avanzados de aviación. Instituto Mexicano del Petroleo. 38.

[4] ARIAS P.M.T., A.J. Martínez R., R.O. Cañizares V. (2013) Producción de biodiésel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Acta Biol. Colomb. 18, 43-68.

[5] CHISTI Y. (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25, 294-306.

[6] RAWAT I., R. Ranjith K., T. Mutanda, F. Bux (2013) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. Applied Energy. 103, 444-467.

[7] BIAIÑ, P., 2010. Estudio y plan de negocios para el desarrollo de una planta de biorreactores de microalgas. Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Departamento de Ingeniería Industrial. 69p.

[8] PEREZ-GARCÍA O., Bashan y. & Ester P.M. (2011) Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. Journal of Phycology. 47,190-199.

[9],[10].

Las microalgas clorófitas son organismos eucariontes unicelulares fotosintéticos que juegan un papel fundamental en la ecología formando parte del primer eslabón de la cadena

trófica en aguas oceánicas y continentales. Son responsables de más de la mitad de la actividad fotosintética del mundo, por lo que son los responsables de casi la mitad del CO₂ fijado y del oxígeno liberado a nivel mundial [11][14].

El flujo de energía en los ecosistemas se inicia con la producción primaria, que es la velocidad con la que la energía lumínica es convertida en energía química. Este es un proceso de dos etapas: la fotosíntesis y la biosíntesis. Las microalgas son uno de los grupos de organismos con mayor eficiencia fotosintética, por su elevado metabolismo y su simplicidad estructural. Pueden capturar alrededor del 3-8% de la radiación fotosintéticamente activa (RFA), mientras que el rendimiento observado en las plantas es de aproximadamente un 0.5% del RFA en energía química. Debido a esto, las microalgas presentan altas tasas de crecimiento y multiplicación celular exponencial [4][15].

Como organismos fotosintéticos, son capaces de fijar altas cantidades de carbono; siendo su demanda estequiométrica de CO₂ de aproximadamente 1.83 kg de CO₂ por cada kilogramo de biomasa seca producida; lo que permitiría acoplar su producción al secuestro y fijación del carbono atmosférico [4][5],[6][15] ZHAO C., T. Brück, J.A. Lercher (2013) Catalytic deoxygenation of microalgae oil to green hydrocarbons. Green Chemistry - Critical Review. 1697-2012.

[16].

Actualmente son consideradas como objeto importante de estudio científico debido a su alta diversidad taxonómica, amplia distribución geográfica y características bioquímicas, a su vez son de interés comercial debido a su potencial como fuente alimenticia, aplicaciones en biorremediación ambiental y como materia prima de biocombustibles de tercera y cuarta generación [14],[1] SEPÚLVEDA I. (2012) Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 579-594.

[2] WILHELM D. G., M. A. Mandegari, S. Farzad, J. F. Gorgens (2016) Techno-economic comparison of biojet fuel production from lignocellulose, vegetable oil and sugar cane juice. Bioresource Technology. 216, 331-339.

[3] AMEZCUA A.M.A., J.C. Gutiérrez V., J.A. Aburto Anell (2016) Combustibles avanzados de aviación. Instituto Mexicano del Petroleo. 38.

- [4] ARIAS P.M.T., A.J. Martínez R., R.O. Cañizares V. (2013) Producción de biodiésel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biol. Colomb.* 18, 43-68.
- [5] CHISTI Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances.* 25, 294-306.
- [6] RAWAT I., R. Ranjith K., T. Mutanda, F. Bux (2013) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy.* 103, 444-467.
- [7] BIAIÑ, P., 2010. Estudio y plan de negocios para el desarrollo de una planta de biorreactores de microalgas. Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Departamento de Ingeniería Industrial. 69p.
- [8] PEREZ-GARCÍA O., Bashan y. & Ester P.M. (2011) Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology.* 47,190-199.
- [9],[17].

1.2. *Scenedesmus* sp.

Las microalgas del género *Scenedesmus* sp. pueden presentar una disposición unicelular en colonias (cenobios) de 2 hasta 32 células, dependiendo principalmente de la fase de crecimiento celular y factores como estrés por movimiento. Comúnmente se encuentran de 4 u 8, arregladas linealmente o en zigzag. Su forma, dependiendo de las condiciones de cultivo, va desde células casi esféricas a elipsoidales. Normalmente la pared celular es lisa; formada de hemicelulosa y un biopolímero similar a la esporopolenina, haciéndola una pared rígida de difícil uso para digestión anaerobia [18]. Este género es comúnmente utilizado en biorremediación para la eliminación de metales, y/o nutrientes en aguas residuales, y en condiciones de cultivo en laboratorio llega a presentar de 20 a 35% en contenido de lípidos totales; su rango óptimo de crecimiento es amplio y se encuentra entre 14 y 30 °C, dentro del cual las tasas de crecimiento varían poco [19],[20].

La provisión de elementos biogénicos, principalmente nitrógeno, es uno de los principales factores que regulan el metabolismo de las células algales. El cambio en la proporción de carbono-nitrógeno en el medio de cultivo, es conocido que resulta en un cambio en la dirección del metabolismo de la célula (en la mayoría de las microalgas). Un incremento en esta proporción resulta en una acumulación de lípidos, principalmente triacilglicéridos y/o carbohidratos lo cual viene acompañado por considerables reacomodos en la composición de ácidos grasos totales. Estos reacomodos consisten en un incremento en el contenido de ácidos grasos saturados y un decremento en ácidos grasos poliénoicos. Además, un

decremento en la concentración de clorofila *a*, acompañado por un decremento en el contenido de carotenoides se ha observado bajo condiciones limitadas de nitrógeno [21].

Debido a su perfil lipídico y su potencial de acumular ácidos grasos susceptibles de transformar a biocombustibles; algunas especies del género están siendo estudiadas por su potencial como materia prima para biocombustibles y la producción de energía renovable [20]. Dentro de sus principales componentes presentan ácidos grasos (ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico), esteroides (colesterol, ergosterol), hidrocarburos (pentacoseno, heptadecano) [22],[23],[24],[25].

Existen diversos estudios que reportan el perfil de lípidos en este género de microalgas para la producción de biocombustibles, principalmente para biodiésel (Tabla 1.1)

Tabla 1.1. Cultivos de *Scenedesmus* sp. para la producción de biocombustibles

ESPECIE	MEDIO DE CULTIVO	RENDIMIENTO ACEITE	PRODUCTO	REFERENCIA
<i>S. obliquus</i>	ARS - Melaza	70 mg/L	Bioturbosina, Diésel verde	[26]
<i>S. abundans</i>	Medio - NaNO ₃ TAP	39 mg/L/d	Biodiésel	[27]
<i>Scenedesmus</i> sp.	(Tris-Acetato-Fosfato)	137.5 mg/L/d	Biodiésel	[23]
<i>S. obliquus</i>	BG-11 + CO ₂ -N ₂	207 mg/L/d	Biodiésel	[28]
<i>S. acutus</i>	Agua residual y Fertilizante	278 y 196.6 mg/L	Biodiésel	[29]
<i>S. obliquus</i>	Efluente cervecero	240 mg/L	Biodiésel	[30]
<i>S. obliquus</i>	Efluente acuícola	115 mg/L	Biodiésel	[31]
<i>S. obliquus</i>	Agua residual, Efluente acuícola y Gallinaza	957, 279 y 287 mg/L	Biodiésel	[22]

Scenedesmus sp. es un género microalgal de fácil cultivo, las especies que lo conforman se emplean no solo en estudios para la producción de biocombustibles, sino también para la mitigación de CO₂ atmosférico y la biorremediación de aguas residuales. *Scenedesmus obliquus* como especie se le considera como uno de los mejores candidatos para la producción de biocombustibles, entre la mayoría de las especies de microalgas. Da valor agregado a la cadena de producción del biocombustible, disminuyendo el impacto

ambiental al no requerir de nutrientes porque aprovecha los presentes en cuerpos de agua eutrofizados, así como de los residuos agroindustriales que se emplean como fuentes de carbono y nitrógeno [19].

1.3. Sistemas de producción microalgal

Los cultivos microalgales han sido desarrollados en gran variedad de sistemas. Estos se dividen principalmente en dos tipos: abiertos o cerrados. Entre los sistemas cerrados se encuentran los fotobiorreactores, los cuales pueden presentar una conformación plana o tubular; ya sea horizontal o vertical. Algunos ejemplos son las columnas de burbujeo, tipo airlift y tanques agitados. Comúnmente se trabajan en interiores y pueden ser ampliamente monitoreados, lo que permite a su vez poder controlar iluminación, temperatura, nutrientes, pH, gases suministrados (CO₂), agentes externos y microalgas competitivas [11],[5].

Los sistemas abiertos son menos predecibles y más difíciles de controlar por la cantidad del volumen de trabajo y su disposición a estar al aire libre. Entre ellos se contemplan tanques al aire libre, lagunas abiertas o "raceways", los cuales tienen el mismo diseño que las lagunas de oxidación de alta tasa. Estas últimas dos configuraciones son de forma elipsoidal con una separación central que permite formar canales poco profundos en forma de circuito cerrado; y mantienen el medio en agitación mediante paletas giratorias. Los sistemas de cultivo al exterior, aunque suelen ser menos caros, hacen que sea más difícil el crecimiento de cultivos de microalgas específicas durante periodos prolongados [11][5]. De entre los distintos tipos de cultivos utilizados en todo el mundo, el más adoptado es por lotes [1] SEPÚLVEDA I. (2012) Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 579-594.

[2] WILHELM D. G., M. A. Mandegari, S. Farzad, J. F. Gorgens (2016) Techno-economic comparison of biojet fuel production from lignocellulose, vegetable oil and sugar cane juice. Bioresource Technology. 216, 331-339.

[3] AMEZCUA A.M.A., J.C. Gutiérrez V., J.A. Aburto Anell (2016) Combustibles avanzados de aviación. Instituto Mexicano del Petroleo. 38.

[4] ARIAS P.M.T., A.J. Martínez R., R.O. Cañizares V. (2013) Producción de biodiésel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Acta Biol. Colomb. 18, 43-68.

[5] CHISTI Y. (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25, 294-306.

- [6] RAWAT I., R. Ranjith K., T. Mutanda, F. Bux (2013) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*. 103, 444-467.
- [7] BIAIÑ, P., 2010. Estudio y plan de negocios para el desarrollo de una planta de biorreactores de microalgas. Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Departamento de Ingeniería Industrial. 69p.
- [8] PEREZ-GARCÍA O., Bashan y. & Ester P.M. (2011) Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*. 47,190-199.
- [9].

1.3.1. Medios de cultivo

Uno de los obstáculos en la producción a gran escala de microalgas es la formulación, preparación y selección de un medio de cultivo químico y económicamente apropiado. Las microalgas, como el resto de los microorganismos, responden a las variaciones en la concentración de nutrientes, se desarrollan y multiplican con relación a las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo, entre otras variables. Los factores que pueden llegar a ser limitantes en el crecimiento celular son los macronutrientes como el carbono, nitrógeno, fósforo, silicio, magnesio, potasio y calcio, que se requieren en cantidades relativamente grandes, mientras que los llamados micronutrientes (hierro, manganeso, cobre, zinc, sodio, molibdeno, cloro y cobalto) se necesitan en menores cantidades (Figura 1.1). Para aquellas especies de microalgas auxótrofas, la concentración de un nutriente específico puede afectar la producción fotosintética, la tasa de división celular y también la composición bioquímica. Por ello, se necesita incluir en el medio de cultivo, sustancias orgánicas como vitaminas y aminoácidos, las cuales resultan necesarias para su crecimiento; como en el caso de *Platimonas*, *Chrysophytas* y algunas *Bacillariophyceas* [32],[33],[34].

La composición específica de estos micronutrientes, macronutrientes y sustancias orgánicas, conforman el medio de cultivo. En conjunto con factores externos como la temperatura, iluminación (intensidad, longitud de onda y fotoperiodo), el pH del medio, aireación (GEI, CO₂) inciden en el crecimiento y metabolismo de las microalgas [33],[35]. La concentración y composición varía ampliamente dependiendo de la especie a cultivar.

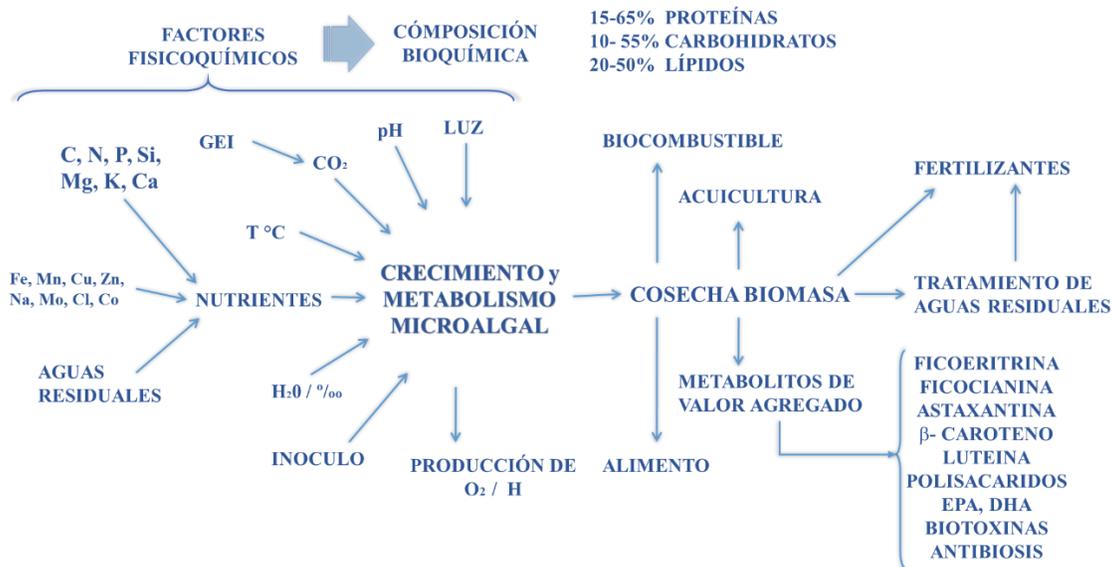


Figura 1.1. Recursos, usos y productos de las microalgas

Así como las microalgas crecen en medios de cultivo específicos, también se pueden adaptar para la remoción o biotransformación de contaminantes presentes en el agua o aire. La ficorremediación es un tipo de biorremediación con la característica específica de usar microalgas; y ésta se basa en la capacidad de los organismos fotosintéticos de metabolizar varios tipos de ácidos orgánicos, fuentes de nitrógeno, fósforo y metales pesados presentes en el agua residual [8],[36]. Si bien *Scenedesmus obliquus* es una especie facultativa y puede crecer de manera fotoautotrófica, heterotrófica y mixotrófica, acoplándose al aprovechamiento de los macronutrientes ya sean si su disposición es orgánica o inorgánica [37],[38]. Liao en 2014 menciona que los registros de cantidades altas de biomasa, densidad celular y producción de lípidos en microalgas se dan bajo condiciones heterotróficas y mixotróficas, en exclusiva de esta última se registran altas tasas de crecimiento y productividades de biomasa [19].

El proceso de eutrofización por actividad antropogénica es uno de los principales retos ambientales; Pérez-García (2011) propuso la utilización de microalgas y bacterias en un consorcio encapsuladas en pequeñas esferas de agar para tratamiento terciario de aguas residuales, logrando disminuir en gran cantidad la presencia de amonio en condiciones autotróficas y fosfatos en condiciones heterotróficas [8].

1.3.2. Importancia biotecnológica

Los compuestos bioquímicos que producen las microalgas se dividen en dos grupos principales: metabolitos primarios y secundarios. Los primarios son compuestos indispensables para funciones vitales, a diferencia de los secundarios que cumplen un rol ecológico mediando la interacción de la microalga con su ambiente[39]. Estos metabolitos secundarios son de especial importancia biotecnológica y comercial, ya que presentan aplicaciones médicas, bioquímicas y energéticas. Sus aplicaciones van desde antioxidantes, nutraceuticos, fragancias, saborizantes, antibióticos, bio-toxinas, alcaloides, giberelinas, bromofenoles, colorantes siendo por lo general compuestos lipídicos [40,[41]. Por otro lado, la fracción lipídica microalgal ha sido estudiada los últimos años como posible recurso alternativo para la obtención de biocombustibles [33,[35].

1.3.3. Microalgas como materia prima de lípidos

Las microalgas representan un recurso renovable y explotable. Tanto el aceite como la biomasa basados en microalgas presentan varias superioridades sobre los cultivos oleaginosos terrestres (jatropha, higuera, palma); principalmente una tasa de crecimiento elevada para microalgas, con la capacidad de duplicar su biomasa en 24 h. Otra ventaja es que los lípidos sintetizados por las microalgas se producen como parte integral de la célula microalgal completa, mientras que en las plantas sólo se producen en semillas, granos y frutos. Por esta razón, la concentración promedio de aceite microalgal (dependiendo de la especie) llega a ser del 20 al 50% del peso seco total de la biomasa. Además, la biomasa puede ser producida todo el año, mientras que las plantas terrestres responden de dos a tres cosechas anuales. Otra ventaja es que no son utilizadas para consumo humano directo; por lo que su producción no compite por los recursos agrícolas, ni en costos económicos relacionados con los insumos alimenticios en comparación con cultivos oleaginosos terrestres. Se ha reportado que la producción de lípidos microalgales es superior a la de cualquier planta de 7 a 31 veces [5,[1] SEPÚLVEDA I. (2012) Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 579-594.

[2] WILHELM D. G., M. A. Mandegari, S. Farzad, J. F. Gorgens (2016) Techno-economic comparison of biojet fuel production from lignocellulose, vegetable oil and sugar cane juice. Bioresource Technology. 216, 331-339.

- [3] AMEZCUA A.M.A., J.C. Gutiérrez V., J.A. Aburto Anell (2016) Combustibles avanzados de aviación. Instituto Mexicano del Petroleo. 38.
- [4] ARIAS P.M.T., A.J. Martínez R., R.O. Cañizares V. (2013) Producción de biodiésel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Acta Biol. Colomb. 18, 43-68.
- [5] CHISTI Y. (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25, 294-306.
- [6] RAWAT I., R. Ranjith K., T. Mutanda, F. Bux (2013) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. Applied Energy. 103, 444-467.
- [7] BIAÑ, P., 2010. Estudio y plan de negocios para el desarrollo de una planta de biorreactores de microalgas. Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Departamento de Ingeniería Industrial. 69p.
- [8] PEREZ-GARCÍA O., Bashan y. & Ester P.M. (2011) Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. Journal of Phycology. 47,190-199.
- [9],[36].

1.3.4. Lípidos microalgales y su potencial para biocombustibles

La producción de aceites a partir de cultivos energéticos como las microalgas, ha sido un tema importante de interés mundial en las últimas décadas. Estos aceites son de particular importancia debido a su naturaleza renovable, su producción amigable con el ambiente, su acoplamiento con el secuestro de CO₂ atmosférico y a su posibilidad de conversión a biocombustibles [42].

En cultivos microalgales se puede aumentar la acumulación de lípidos, disminuyendo la concentración de un nutriente en el medio de cultivo, convirtiéndose este en factor limitante del crecimiento; una condición de estrés. El tratamiento más efectivo para aumentar la acumulación de lípidos es mediante la limitación de nitrógeno, que además de generar una acumulación, también da lugar a un cambio gradual de la composición lipídica de ácidos grasos libres a triacilglicéridos (TAGs); disminuyendo la multiplicación celular. Sin embargo, el carbono sigue siendo asimilado por las células, dirigiéndose a la formación de TAGs, almacenándose en las células y aumentando éstas de peso y tamaño [43],[44],[45]. Otros factores que pueden influir son la iluminación (intensidad y calidad), ciclo luz-oscuridad, temperatura, pH, salinidad, fase de crecimiento y estado fisiológico [25],[46],[47],[48].

Los ácidos grasos (AG) presentes en los lípidos microalgales en su mayoría son moléculas de cadena recta con un número par de átomos de C (generalmente entre C12 y C22)

resultado de su biosíntesis desde acetato por α -adición. Pueden ser saturados o insaturados [5,[49]. Entre ellos se incluyen el ácido palmítico, el ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico; estos tres últimos ácidos grasos son los más abundantes en la composición del perfil de aceites [50]. Forman ésteres de glicerol (triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos) y junto con los fosfolípidos y los glucolípidos constituyen la mayor fracción de lípidos (20 al 40% de los lípidos totales). El extracto lipídico de microalgas posee el olor y sabor característicos del aceite de pescado; ya que contienen una alta proporción de DHA y EPA. Estos ácidos grasos insaturados presentan inestabilidad oxidativa en presencia de temperaturas altas, luz y oxígeno causando procesos de oxidación irreversibles (degradación oxidativa) que llevan a malos sabores (rancidez) [47][51].

1.4. Bioenergéticos a partir de microalgas

Entre los energéticos que se pueden producir por cultivos microalgales se encuentran el biogás, producido mediante digestión anaeróbica de la biomasa; hidrógeno producido por unas especies mediante la fotosíntesis, así también con digestión anaeróbica (fermentación oscura y fotoheterotrófica); gas de síntesis, a través de procesos termoquímicos a la biomasa; biodiésel derivado de la transesterificación del aceite microalgal; diésel verde y bioturbosina a través de catálisis heterogénea. Esto vuelve a las microalgas una de las fuentes de materia prima para biocombustibles más prometedoras [11,[52],[53] entre los cultivos energéticos. En la Figura 1.2, se muestran las rutas metabólicas que pueden llevarse a cabo durante el cultivo microalgal, así como los procesos que pueden darse a la fracción lipídica y a la biomasa, para la obtención de distintos tipos de bioenergéticos.

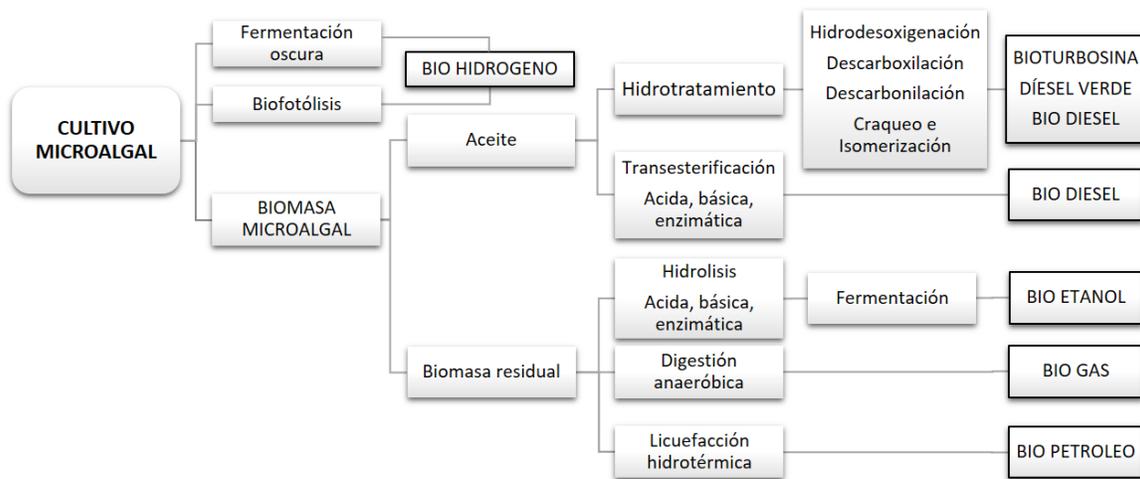


Figura 1.2. Bioenergéticos a partir de microalgas. Basado en [11]

1.5. Biocombustibles

Los biocombustibles se refieren a combustibles sólidos, líquidos o gaseosos que son producidos principalmente a partir de materia prima renovable de base celulósica (biomasa). Tienen la ventaja, sobre los combustibles fósiles, de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero; son biodegradables y presentan amplia disponibilidad, además de los beneficios que brindan con respecto al desarrollo regional, como la creación de trabajos de manufactura rural [1] SEPÚLVEDA I. (2012) Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 579-594.

- [2] WILHELM D. G., M. A. Mandegari, S. Farzad, J. F. Gorgens (2016) Techno-economic comparison of biojet fuel production from lignocellulose, vegetable oil and sugar cane juice. Bioresource Technology. 216, 331-339.
- [3] AMEZCUA A.M.A., J.C. Gutiérrez V., J.A. Aburto Anell (2016) Combustibles avanzados de aviación. Instituto Mexicano del Petroleo. 38.
- [4] ARIAS P.M.T., A.J. Martínez R., R.O. Cañizares V. (2013) Producción de biodiésel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Acta Biol. Colomb. 18, 43-68.
- [5] CHISTI Y. (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25, 294-306.
- [6] RAWAT I., R. Ranjith K., T. Mutanda, F. Bux (2013) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. Applied Energy. 103, 444-467.

[7] BIAIÑ, P., 2010. Estudio y plan de negocios para el desarrollo de una planta de biorreactores de microalgas. Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Departamento de Ingeniería Industrial. 69p.

[8] PEREZ-GARCÍA O., Bashan y. & Ester P.M. (2011) Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. Journal of Phycology. 47,190-199.

[9],[54]. Por otro lado, la cantidad de oxígeno contenida en sus moléculas es mayor en biocombustibles líquidos (bioetanol, biodiésel) que en los fósiles, lo cual es una ventaja en el proceso de combustión. El bioetanol es una molécula polar y en su producción puede arrastrar agua y pueden por lo tanto ser ligeramente ácido (biodiésel). Para el caso de la bioturbosina, debido al hidrotreatmento para su obtención, en general no contiene oxígeno, nitrógeno o azufre [55],[56], por lo que es más parecida al combustible de aviación de origen fósil.

1.5.1. Generaciones de biocombustibles

Basados en el origen de la materia prima y en los procesos de producción, pueden ser clasificados en 4 diferentes generaciones (Tabla 1.2). Los biocombustibles de 1ª generación son producidos a partir de cultivos agrícolas como la caña de azúcar, remolacha azucarera y granos como el maíz o la avena, que producen los carbohidratos que son fermentados a etanol; grasas animales, granos y semillas oleaginosas como colza o canola, soja, girasol, palma de aceite que se prensan para obtener aceite vegetal y posteriormente transformarlo a biodiésel. Las materias primas de primera generación sirven como alimento o compiten con los recursos para producirlos. La mayoría de los biocombustibles de esta generación incluyen biodiésel, bioetanol, biobutanol, biogás [36],[52] y son considerados de tecnología convencional y madura debido a que han sido utilizadas en los últimos 20 años.

Los biocombustibles de segunda generación se producen a partir de biomasa obtenida de una manera más sustentable, siendo neutros en carbono e incluso negativos en término de su impacto en concentraciones de CO₂. Son derivados de cultivos lignocelulósicos como los residuos agroindustriales y forestales (madera, paja de trigo, bagazo de caña), para la obtención de etanol, metano o hidrógeno. También se obtienen de cultivos energéticos que no son comestibles como jatropha (piñón), higuera y palma para la producción de biodiésel. Aunque reducen los problemas de los biocombustibles de 1ª generación, mantienen la competencia por el uso de tierra con los cultivos alimenticios y mucha de la energía es necesaria para la cosecha, transporte y procesamiento [1] SEPÚLVEDA I.

(2012) Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 579-594.

[2] WILHELM D. G., M. A. Mandegari, S. Farzad, J. F. Gorgens (2016) Techno-economic comparison of biojet fuel production from lignocellulose, vegetable oil and sugar cane juice. *Bioresource Technology*. 216, 331-339.

[3] AMEZCUA A.M.A., J.C. Gutiérrez V., J.A. Aburto Anell (2016) Combustibles avanzados de aviación. Instituto Mexicano del Petroleo. 38.

[4] ARIAS P.M.T., A.J. Martínez R., R.O. Cañizares V. (2013) Producción de biodiésel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biol. Colomb.* 18, 43-68.

[5] CHISTI Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25, 294-306.

[6] RAWAT I., R. Ranjith K., T. Mutanda, F. Bux (2013) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*. 103, 444-467.

[7] BIAÑ, P., 2010. Estudio y plan de negocios para el desarrollo de una planta de biorreactores de microalgas. Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Departamento de Ingeniería Industrial. 69p.

[8] PEREZ-GARCÍA O., Bashan y. & Ester P.M. (2011) Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*. 47,190-199.

[9],[36],[52],[1],[2].

Los biocombustibles de 3ª generación, en su mayoría se derivan de algas, microalgas oleaginosas y otros microorganismos; y se consideran una fuente de energía alternativa que contribuyen a la reducción del uso de tierra cultivable y su potencial de rendimiento de energía por hectárea es mucho mayor a los procesos de 1ª y 2ª generación [36][52].

Una 4ª generación de biocombustibles está surgiendo a nivel de investigación básica, mediante la investigación de microorganismos fotosintéticos transformados mediante ingeniería genética. Estos biocombustibles se conocen como combustibles solares fotobiológicos y electrocombustibles. La tecnología para la producción de estos biocombustibles solares es un campo emergente y se basa en la conversión directa de la energía solar en combustible utilizando materias primas inagotables, baratas y ampliamente disponibles. Por otro lado, el desarrollo de una combinación de catalizadores fotovoltaicos o de electrolisis con ingeniería metabólica para la producción de combustibles microbianos

(electro-biocombustibles), es una tecnología emergente para una producción eficiente y mejor almacenamiento de combustibles líquidos [57].

Tabla 1.2. Clasificación de biocombustibles basado en la materia prima para su producción
[1] SEPÚLVEDA I. (2012) Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 579-594.

- [2] WILHELM D. G., M. A. Mandegari, S. Farzad, J. F. Gorgens (2016) Techno-economic comparison of biojet fuel production from lignocellulose, vegetable oil and sugar cane juice. *Bioresource Technology*. 216, 331-339.
- [3] AMEZCUA A.M.A., J.C. Gutiérrez V., J.A. Aburto Anell (2016) Combustibles avanzados de aviación. *Instituto Mexicano del Petroleo*. 38.
- [4] ARIAS P.M.T., A.J. Martínez R., R.O. Cañizares V. (2013) Producción de biodiésel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biol. Colomb*. 18, 43-68.
- [5] CHISTI Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25, 294-306.
- [6] RAWAT I., R. Ranjith K., T. Mutanda, F. Bux (2013) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*. 103, 444-467.
- [7] BIAÑ, P., 2010. Estudio y plan de negocios para el desarrollo de una planta de biorreactores de microalgas. *Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Departamento de Ingeniería Industrial*. 69p.
- [8] PEREZ-GARCÍA O., Bashan y. & Ester P.M. (2011) Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*. 47, 190-199.

[9],[52],[57]

GENERACIÓN	MATERIA PRIMA	BIOCOMBUSTIBLE
Primera	Maíz, azúcar, almidón, aceites vegetales, grasas animales	Bio-alcoholes, biodiésel, bio-gas
Segunda	Biomasa lignocelulósica Paja, madera, residuos sólidos, cultivos energéticos. No cultivos de consumo humano	Bio-alcoholes, bio-aceite, bio-hidrógeno, biodiesel por Fischer-Tropsch, diésel de madera, bio-syngas
Tercera	Algas, microalgas	biogasolina, bioturbosina, biodiésel, diésel verde
Cuarta	Microalgas, cianobacterias, bacterias	Electrobiocombustibles: H ₂ , etanol, isobutanol, isopropanol

Hoy en día existen algunas barreras para el desarrollo de la producción de biocombustibles como lo son la falta de tecnología, no son económicamente viables, fuentes de materia prima y principalmente políticas donde se establezcan reglamentos de almacenamiento, seguridad, producción, materia prima, entre otros. Los costos de producción aún son inciertos y varían de acuerdo con la disponibilidad de la materia prima.

1.6. Combustibles de aviación

Estos incluyen la turbosina para los motores de turbina y la gasolina de aviación para los motores de pistón. El combustible más usado es la turbosina, originaria del petróleo crudo. Este combustible es una mezcla extraída de la fracción queroseno del petróleo crudo, la cual es destilada entre la fracción gasolina y la fracción del diésel. Resulta en una mezcla de hidrocarburos parafínicos y aromáticos que se utiliza como combustible en motores de aviación a turbina. Este tipo de combustible tiene como característica que su peso específico a 20 °C oscila entre los 0.772 a 0.837 kg L⁻¹ y su temperatura de inflamación es de 38 °C y la de congelación -47 °C [58],[59].

La turbosina es muy similar al keroseno (destilado número 2 del petróleo) y puede ser adecuadamente representada por el n-decano (C₁₀H₂₂). Éste es un alcano alifático (hidrocarburo saturado) que sólo está formado por átomos de carbono e hidrógeno.

El gas avión es un líquido de alto octanaje obtenido a partir de la desintegración catalítica de los gasóleos pesados, que a su vez son un destilado intermedio del crudo. Se emplea como combustible en aviones de pistón [58].

1.6.1. Bioturbosina

El combustible de aviación producido a partir de cultivos bioenergéticos se conoce como bioturbosina. Debido a la naturaleza renovable de la materia prima, la bioturbosina tiene el potencial de reducir las emisiones asociadas con la industria de la aviación [60].

La bioturbosina denominada también bioqueroseno parafínico sintético es producida a partir de cultivos energéticos renovables de segunda, tercera o cuarta generación. Es un biocombustible sintético conformado por una mezcla de hidrocarburos lineales y ramificados; su densidad energética y sus propiedades físicas se apegan a las características de la turbosina convencional [59].

Por otra parte, la principal diferencia de la bioturbosina con respecto a la turbosina convencional se presenta en la ausencia de compuestos aromáticos; esto provoca que la densidad se encuentre por debajo del mínimo establecido en las especificaciones, con lo cual se podrían ocasionar fugas en el circuito de distribución del combustible. Tales desventajas desaparecen cuando el combustible se utiliza en una mezcla con el combustible fósil. Por esta razón, la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) establece en la norma D7566 el uso de mezclas producidas por hidrotreamiento de ácidos grasos y ésteres (proceso HEFA) con queroseno convencional hasta un 50%. Un ejemplo fue el vuelo comercial realizado por Aeroméxico desde la ciudad de México D.F. a la ciudad de Sao Paulo, Brasil con una mezcla de 50:50 de combustible tradicional con combustibles renovables generados a partir de aceite de cocina, jatropha y camelina [3].

1.6.2. Síntesis de bioturbosina

Los procesos de producción de la bioturbosina deben tener menos impactos ambientales que su contraparte fósil, incluyendo una menor huella de carbono y reducción de las emisiones de gas de efecto invernadero (GEI); lo cual aporta sostenibilidad al proceso.

Existen diferentes procesos para la obtención de bioturbosina según la naturaleza de la biomasa; pero son 4 los procesos certificados ante la ASTM D-7566-16b desde el 11 de Julio de 2011 (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Procesos de producción de bioturbosina aprobados por la ASTM [3]

PROCESO	FUNDAMENTO	MATERIA PRIMA	TECNÓLOGO
FT-SPK	Gasificación de biomasa	Carbón, gas natural, biomasa	Sasol, Shell, Syntroleum
HEFA	Hidroprocesamiento de ácidos grasos y sus ésteres	Aceite vegetal, animal o de reúso	Honeywell, UOP, Neste Oil, Dynamic Fuels, EERC, IMP
SIP	Hidrotreamiento de parafinas obtenidas por fermentación	Azúcares	Amyris, Total
ATJ	Obtención de alcohol, deshidratado y oligomerización	Almidones, azúcares, biomasa celulósica	Gevo, Cobalt, Honeywell, UOP, Lanzatech, Swedish Biofuels, Biogy

En México estas tecnologías apenas empiezan a desarrollarse, sobresaliendo los esfuerzos que el Instituto Mexicano del Petróleo ha desarrollado desde el año 2015. A continuación, se describen estos procesos.

1.6.2.1. Proceso Fischer-Tropsch

El proceso Fischer-Tropsch (FT) desarrollado por los alemanes Franz Fischer y Hans Tropsch en 1920, fue uno de los primeros procesos certificados por la ASTM en 2009 para la fabricación de combustible de avión. Consiste en la conversión de la biomasa mediante un proceso de gasificación a alta temperatura. En este proceso se obtiene una mezcla gaseosa rica en hidrógeno y monóxido de carbono conocida como gas de síntesis o “syngas”. Posteriormente se utiliza el proceso FT para convertir catalíticamente el gas de síntesis a productos líquidos que pueden ser refinados en querosenos parafínicos sintéticos, gasolina y lubricantes [61]. Existe una variante del proceso FT, en la cual se procede con la gasificación de la biomasa y se obtienen aromáticos que son alquilados a olefinas [3]. SASOL, una empresa en Sudáfrica utiliza la producción de líquidos mediante el proceso FT.

1.6.2.2. Proceso SIP

Proceso aprobado en junio de 2014, se le conoce como combustible iso-parafínico sintetizado. Donde a través de la manipulación genética de las rutas metabólicas celulares, se es capaz de diseñar microorganismos que convierten los azúcares de origen vegetal, a partir de cultivos como caña de azúcar o el sorgo, en moléculas específicas. Pueden ser hidrocarburos que sustituyan a los productos petroquímicos, incluidos los biocombustibles para el transporte vehicular y de aviación.

La compañía LS9 desarrolló en 2010 la transformación genética de cianobacterias con genes que permiten la producción de alcanos, que son los hidrocarburos primarios de combustibles como la gasolina, diésel y turbosina. Este desarrollo es la primera descripción de genes responsables de la biosíntesis de un alcano y el primer ejemplo de una conversión en un solo paso de azúcar a combustible de grado alcanos, que no requiere elevadas temperaturas, altas presiones, catalizadores inorgánicos, hidrógeno u operaciones unitarias complejas [62].

1.6.2.3. Proceso ATJ

Alcohol a bioturbosina (ATJ, por sus siglas en inglés) también llamada oligomerización de alcohol; es un proceso por el cual alcoholes de cadena corta como etanol, metanol, butanol y alcoholes grasos de cadena larga, son producidos convencionalmente mediante fermentación de azúcares o almidón y posteriormente son convertidos químicamente a alcanos de cadena más larga, C₁₂ a C₁₆, como los constituyentes de la bioturbosina. La empresa Gevo desarrolló un proceso que consiste en una levadura que convierte los azúcares en isobutanol. El alcohol es convertido entonces en queroseno isoparafínico (una mezcla utilizada en combustible para aviación) a través de reacciones de deshidratación, oligomerización, hidrogenación y destilación [63].

1.6.2.4. Proceso HEFA

El Hidro-procesado de Ésteres y Ácidos Grasos (HEFA, por sus siglas en inglés) fue certificado en 2011 por la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales para la producción de biocombustibles y su mezcla de hasta un 50% con turbosina de origen fósil. Este proceso de producción se encuentra ampliamente desarrollado a nivel internacional y en México aún no se desarrolla. La bioturbosina obtenida mediante esta ruta de producción, ha sido utilizada en el transporte aéreo comercial a través del organismo gubernamental de Aeropuertos y Servicios Auxiliares (ASA), así como Petróleos Mexicanos (PEMEX) y por aerolíneas como Aeroméxico, Volaris e Interjet [63].

1.7. Hidrotratamiento de aceites

En el hidropocesamiento de hidrocarburos, la materia prima se hace reaccionar con H₂ a alta presión y temperatura en presencia de catalizadores que promueven reacciones estequiométricas. Durante el hidropocesamiento de los triacilgliceridos (TAGs) contenidos en los aceites vegetales, algales o de grasas animales, se promueven reacciones de hidrogenación de dobles enlaces y reacciones donde el contenido de oxígeno presente en los aceites y cercanos a ciertos anillos aromáticos se reducen por saturación de los dobles enlaces C=O, mediante la ruptura de enlaces C-O y formación de enlaces C-H. A estas reacciones se les conoce como hidrogenación. Por lo tanto, para reducir el contenido de oxígeno molecular, los enlaces se saturan con hidrógeno; pudiendo ocurrir reacciones simultáneas como hidrogenólisis (o craqueo de enlaces C-C), isomerización e hidratación. La hidrodeshoxigenación (HDO) aumenta la densidad energética y la estabilidad de los combustibles producidos, reduciendo también la viscosidad [64],[65].

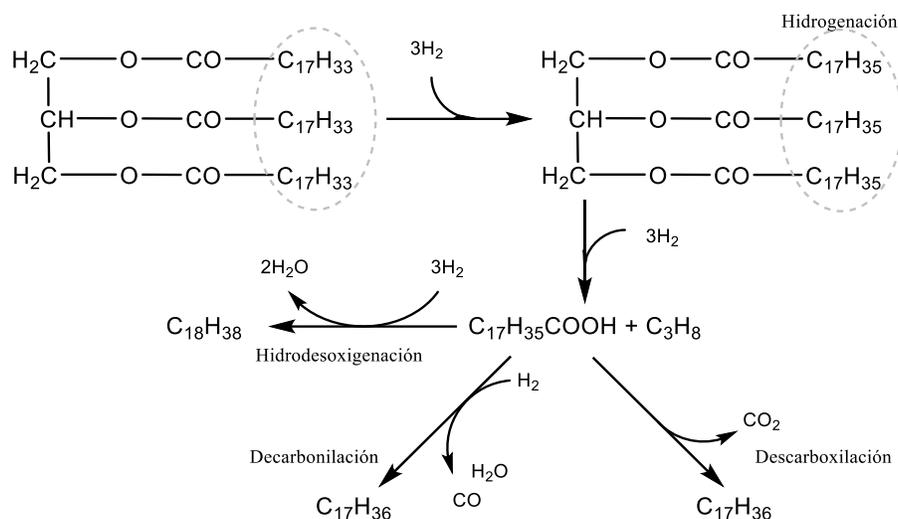
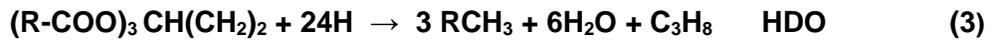
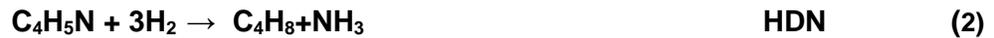


Figura 1.3. Reacciones estequiométricas en la conversión de hidrocarburos, basado en [66]

Después de la hidrogenación, la molécula de triglicérido se disocia en una molécula de propano y tres moléculas intermediarias (ácidos carboxílicos) que son posteriormente convertidas en alcanos mediante 3 posibles mecanismos de desoxigenación (Figura 1.3). Eliminando el oxígeno en forma de agua (hidrodeseoxigenación), monóxido de carbono y agua (descarboxilación) y dióxido de carbono (decarbonilación). Tanto la hidrogenación de los dobles enlaces presentes en la cadena de ácidos grasos, así como la desoxigenación del TAG resulta en la formación de agua, compuestos parafínicos (n-parafinas) que mantienen la longitud de su cadena original, y propanol consecuencia de la HDO del glicerol residual [3,[66],[67],[68].

Durante la HDO, los catalizadores promueven la eliminación de azufre, como sulfuro de hidrógeno (Hidrodeseulfurización, HDS, Ecuación 1), el nitrógeno, como amoníaco (Hidrodeseoxigenación, HDN, Ecuación 2) y el oxígeno, que se elimina bajo la forma de agua (Hidrodeseoxigenación, HDO, Ecuación 3). Para el caso del crudo del petróleo, el contenido del oxígeno es alrededor de 2%, en crudos sintéticos (derivados del carbón) en torno al 10% y concretamente en el caso de la biomasa, este valor podría alcanzar valores de 50% de contenido de oxígeno.



Las reacciones de hidrodeshidrogenación son altamente exotérmicas y termodinámicamente favorables, pero no suelen tener lugar en ausencia de catalizador, ya que se necesitan temperaturas de reacción muy elevadas para que tengan lugar a velocidad apreciable. Esto es debido a la gran estabilidad que presenta la molécula de hidrógeno, la cual necesita, por tanto, un catalizador que lo quimisorba, debilitando y rompiendo el enlace entre átomos de hidrógeno. El catalizador además debe presentar una alta eficacia y una alta resistencia a la desactivación [65].

1.7.1. Catalizadores para HDO

Los catalizadores pueden clasificarse en 6 grupos. De hidrotratamiento, de metales preciosos, de hidrogenación o metales base, fosfuros metálicos, otros catalizadores metálicos y catalizadores bifuncionales. Los catalizadores más ampliamente empleados en las reacciones de HDO han sido los catalizadores de hidrotratamiento y los de metales preciosos soportados.

Los catalizadores de hidrotratamiento están tradicionalmente ligados a la hidrodesulfuración industrial (HDS) y empleados para la eliminación de azufre, nitrógeno y oxígeno a partir de combustibles derivados del petróleo. Son empleados en la mayor parte de los trabajos en HDO, normalmente sulfuros de Mo, NiMo, CoMo y NiW que actúan como promotor, aunque esto trae consigo la contaminación con azufre del combustible obtenido. Como soportes se emplean alúmina, carbón activo o arcillas porosas. Los catalizadores más comunes son Co-MoS₂ y Ni-MoS₂ [65][69]. El Co y el Ni sirven como promotores que donan electrones a los centros activos, en este caso Mo.

1.7.2. Soportes

En este grupo se incluyen el resto de los catalizadores empleados en reacciones de hidrogenación; como son los metales comunes como Ni, Cu, Co o Fe en forma soportada o en forma de aleación Raney. Concretamente este tipo de catalizadores son empleados en procesos como la hidrogenación de grasas insaturadas, de compuestos olefínicos cíclicos y aromáticos, la reducción de compuestos orgánicos, reacciones de desaminación, etc [63].

Se pueden clasificar los tipos de soporte en función del tipo de material.

Soportes inorgánicos. Alúmina (óxido de aluminio, Al₂O₃), sílice, óxido de circonio, óxido de titanio, óxido de magnesio, sílice-alúmina amorfa y varias zeolitas.

Soportes orgánicos. El principal soporte orgánico es el carbón activado. Su funcionamiento depende de variables como la distribución del tamaño de poros, grupos oxigenados superficiales y la cantidad de impurezas del carbón.

1.7.3. Zeolita

Su nombre significa literalmente “piedra hirviendo” aunque a menudo son llamadas “tamices moleculares”. Son materiales de origen natural o sintético utilizados para la separación selectiva de los componentes de una mezcla, como agua de alcohol [70]. Se clasifican en cerca de 140 tipos de zeolitas naturales y 150 sintéticas, para usos específicos y selectivos [71].

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos compuestos de tetraedros de SiO_4 y AlO_4 unidos. Las conexiones entre estos bloques dan como resultado marcos tridimensionales con una disposición bien definida de poros o canales de dimensiones moleculares. Es posible introducir sitios catalíticamente activos dentro de estos poros, como ácidos de Brønsted. La combinación de las propiedades porosas y ácidas hace que las zeolitas sean muy útiles en diferentes aplicaciones, como en la separación, el intercambio iónico y la catálisis [72]. Las zeolitas tienen una estructura cristalina tridimensional abierta o microporosa con múltiples micro cavidades dentro de los cristales que naturalmente contienen moléculas de agua. Destaca su capacidad de hidratarse y deshidratarse reversiblemente. El agua puede liberarse por calentamiento y la zeolita puede ser usada para absorber otras sustancias de un tamaño molecular apropiado. La estructura está basada en aluminosilicatos ($\text{Na}_{12}[-(\text{SiO}_2)_{12}(\text{AlO}_2)_{12}] 27\text{H}_2\text{O}$) y cationes atrapados dentro de las microcavidades [71]; conteniendo generalmente silicio, aluminio y oxígeno. La unidad de construcción primaria de las zeolitas son los tetraedros $[\text{SiO}_4]^{-4}$ y $[\text{AlO}_4]^{-5}$ unidos por compartición de vértices formando puentes de oxígeno no lineales. Las zeolitas están caracterizadas comercialmente por su radio atómico Si/Al o más comúnmente, por la relación molar $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$. Esta relación determina la cantidad de protones, iones amonio, o iones metálicos que pueden ser intercambiables en la zeolita. A medida que esta relación aumenta, la cantidad de iones que pueden intercambiarse disminuye [73].

Son utilizadas en sistemas de vacío, para separar compuestos orgánicos, como en la gasolina de alto octanaje para obtener gasolina libre de plomo [70][74].

1.7.4. ZSM22

Este soporte tiene una estructura tipo theta 1 que consiste en anillos sencillos (Figura 1.4).

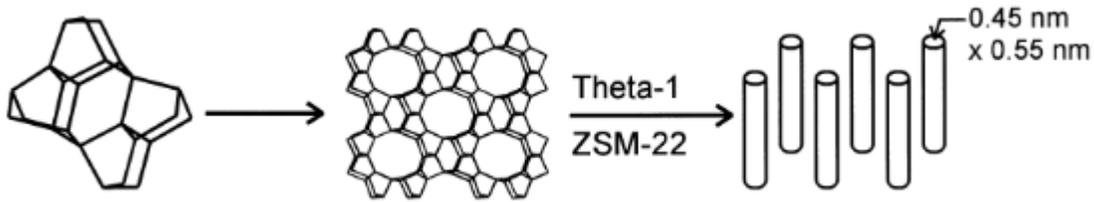


Figura 1.4. Estructura tridimensional de la zeolita ZSM-22 [70]

Presenta una alta actividad, pero tiene una baja selectividad para la hidroisomerización de alcanos de cadena larga. Tiene una apertura de poros elíptica de 0.44×0.55 nm y su tamaño de canal de poro es similar al diámetro cinético de alcanos normales y menor que el de alcanos ramificados. El uso de este tipo de zeolitas en catálisis de hidroisomerización puede transformar alcanos de cadena larga en productos isómeros con altos rendimientos. La impregnación de un catión metálico en la estructura de la zeolita modifica las propiedades de acidez, capacidad de adsorción y de estabilidad térmica; volviéndose más activo catalíticamente cuando es impregnada con platino Pt/ZSM22 [73],[75],[76]. Es utilizada en la transformación de moléculas de n-buteno a hidrocarburos alqueno de estructura ramificada (isobutileno) [76].

JUSTIFICACIÓN

Los aceites derivados de la biomasa de microalgas son una de las principales fuentes potenciales de materia prima para la producción de biocombustibles aeronáuticos. Las microalgas presentan altas tasas de crecimiento y producción de lípidos comparados con cualquier planta superior; mantienen una considerable gama de patrones lipídicos que se deriva en la adaptación a las condiciones de cultivo, pudiendo variar el tipo de perfil de lípidos que se desea y el tipo de biocombustible que se pueda producir.

Tanto la etapa del cultivo de la microalga como la transformación de los lípidos necesitan ser estudiados para lograr un proceso con más altas probabilidades de éxito. De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se evaluó tanto la producción de biomasa microalgal en un medio de agua residual sintética, así como el estudio de la transformación de lípidos microalgales a biocombustible mediante hidrodeseoxigenación.

OBJETIVO GENERAL

Producir bioturbosina por hidroxigenación catalítica a partir de los lípidos de la microalga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing cultivada en fotobiorreactores de 20 L.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer cultivos de la microalga *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactores de 20 L con agua residual sintética.
- Determinar el perfil lipídico de la microalga *Scenedesmus obliquus*.
- Producir bioturbosina a partir de los lípidos de la microalga *Scenedesmus obliquus* por hidroxigenación utilizando el catalizador Pt/ZSM22- γ -Al₂O₃.

CAPITULO 2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Diagrama experimental

El presente trabajo se realizó en dos etapas; primeramente, se llevó a cabo el cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* y la extracción de la fracción lipídica, consecutivamente el hidrotatamiento por catálisis química de los extractos. Las actividades se muestran en la siguiente figura.

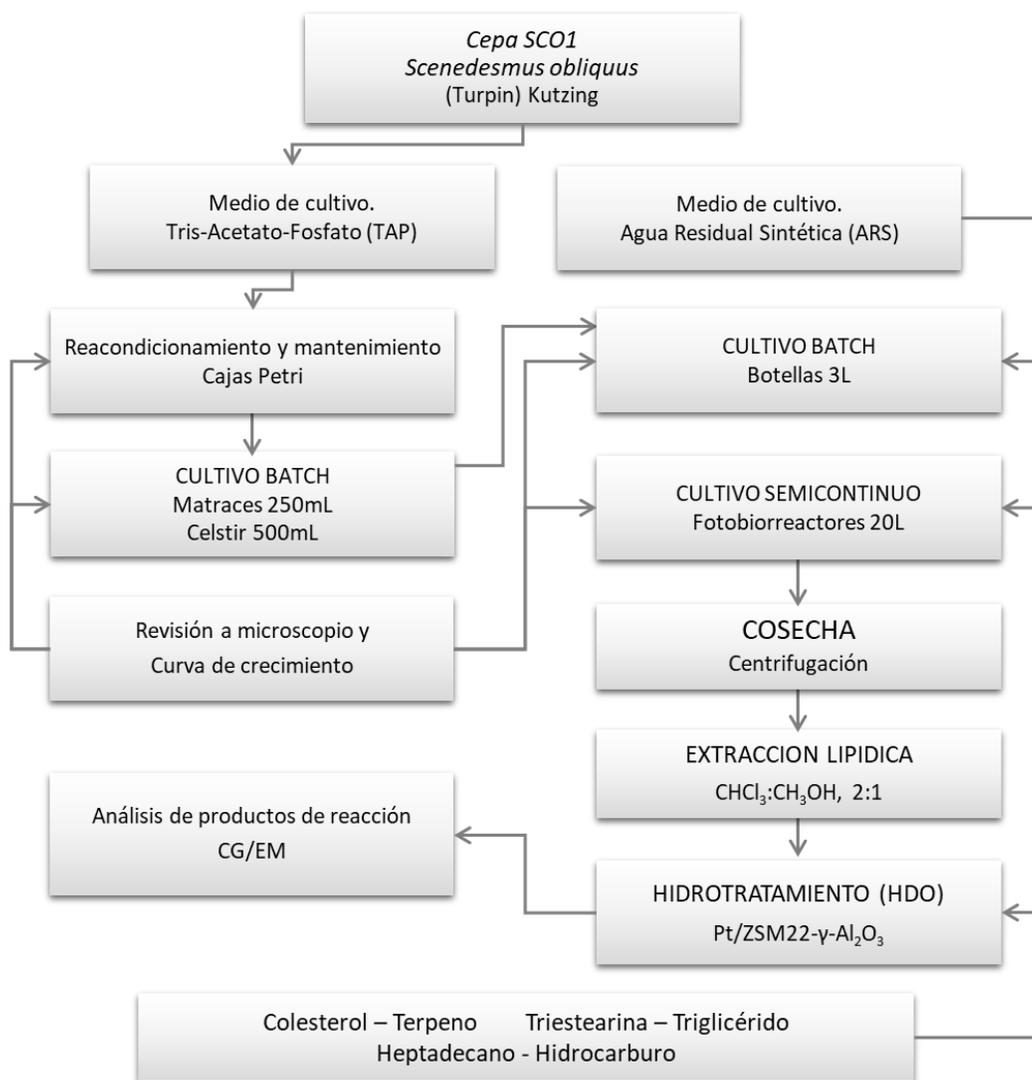


Figura 2.1. Diagrama experimental para la obtención de bioturbosina a partir de aceite de la microalga *Scenedesmus obliquus*

2.2. Cepa *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing

La cepa de la microalga dulceacuícola *Scenedesmus obliquus* con clave SC01; se adquirió de la colección de microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Censada y aislada de un ambiente hiper-eutrófico en Ensenada, B.C., por Leonardo González en 1992; e identificada posteriormente por el Dr. Domenico Voltolina Lobina.

2.3. Medio y condiciones de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo, el medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP, siglas en inglés), y el medio de agua residual sintética (ARS) de Pérez-García; que se utilizó a partir de volúmenes de 2 L de cultivo en botellas de PET de 3 L y de 16 L de cultivo en fotobiorreactores de 20 L [8].

2.3.1. Medio TAP

Se preparó con agua destilada, agregando los stocks de la Tabla 2.1 en el orden que se presentan, ajustándose el pH a 7.0 con HCl 6 M para acidificar o con KOH 1 M para alcalinizar el medio de cultivo. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 psi por un tiempo de 15 minutos.

Se realizaron cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL, Celstir de 500 mL, botellas de 3 L y fotobiorreactores de columna de 20 L. Los pre-cultivos en matraces Erlenmeyer y Celstir se llevaron a cabo en medio TAP y para los cultivos en botellas PET como de los fotobiorreactores de columna, se utilizó en el medio ARS la melaza como fuente de carbono. Los cultivos se desarrollaron con fotoperiodo 16:8 de luz:oscuridad a 25 °C, y con una intensidad lumínica de 81 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca.

Tabla 2.1. Formulación del medio de cultivo TAP

SOLUCIÓN STOCK	CANTIDAD POR LITRO	COMPONENTES	CONCENTRACIÓN g L ⁻¹
Tris-base 1M	20 mL	Tris-base	121.14
Buffer fosfatos	1 mL	K ₂ HPO ₄	108
		KH ₂ PO ₄	56
Metales traza Hunter	1 mL	H ₃ BO ₃	11.4
		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22
		MnCl ₂ · 4H ₂ O	5.06
		FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.99
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.61
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	1.1
Solución A	10 mL	NH ₄ Cl	40
		MgSO ₄ · 7H ₂ O	10
		CaCl ₂ · 2H ₂ O	5
Ác. Acético glacial	1 mL	CH ₃ COOH	1.049

2.3.2. Medio ARS

Los cultivos en agua residual sintética a volúmenes de 2 y 16 L se realizaron con una formulación modificada del medio de cultivo de Pérez-García [8] (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Formulación del medio de cultivo ARS

NUTRIENTES	CANTIDAD PARA 1 L
NaCl	0.01 g
CaCl ₂	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
K ₂ HPO ₄	0.100 g
KH ₂ PO ₄	0.050 g
Na ₂ HPO ₄	0.03 g
NH ₄ Cl	0.192 g
Melaza	0.1% / 1 g
Agua destilada	1000 mL

La melaza fue provista por el Laboratorio de Biomasa de la Unidad de Energía Renovable, proveniente del ingenio azucarero “La Joya” (municipio de Champotón, Campeche, México) fue colectada y donada por la Dra. Liliana Alzate Gaviria; y mantenida en refrigeración a 4 °C.

2.4. Curva de crecimiento

2.4.1. Recuento celular

Para la obtención de las curvas de crecimiento, se tomaron muestras diarias y homogéneas (1 mL), y se calculó la concentración celular (cel mL^{-1}); usando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico Nikon Eclipse E200, con los objetivos 20 y 40X.

El recuento celular se realizó tomando en cuenta las células que quedan dentro de cada una de las cuadrículas marcadas como A, B, C, y D, realizando un promedio de los cuadrantes (Figura 2.2) [33,[77].

Se calculó la concentración celular (cel mL^{-1}) utilizando la siguiente formula.

$$C = N * 10^4 * Dil \quad (4)$$

En donde:

C concentración celular, en cel mL^{-1}

N promedio de las células presentes en 1 mm^2 ($0.1 \mu\text{L}$)

Dil factor de dilución

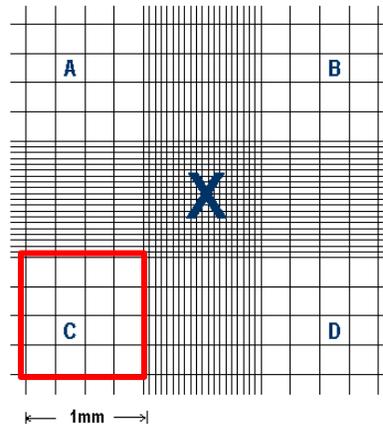


Figura 2.2. Cámara de Neubauer de 9 mm^2

Con los datos de concentración celular de cada conteo, se obtuvo una curva del crecimiento celular graficando en el eje de las "Y" los valores de la concentración celular y en las "X" el tiempo (en días).

2.5. Cultivo de biomasa microalgal

2.5.1. Material (Esterilizado)

Todo el material de cristalería se sometió a una esterilización térmica utilizando una autoclave vertical; a 15 libras por pulgada cuadrada de presión, 121 °C durante 20 minutos.

Las mangueras, tapas y soportes se lavaron y trataron químicamente dejándolas sumergidas por 12 h en cloro diluido al 1% (hipoclorito de sodio al 1% v/v en agua). Se enjuagó el material con agua destilada.

2.6. Purificación de la cepa SC01

2.6.1. Lavados con HCl

El trabajo de limpieza, mantenimiento y purificación de la cepa SC01, se realizó en una campana de flujo laminar ESCO Modelo LHG-4AG-F9 para asegurar un ambiente estéril de trabajo. Se partió de una muestra de cultivo de la cepa SC01 (aprox. 30 mL), se dividió en 3 tubos de 50 mL previamente esterilizados; y se centrifugaron (Orto Alresa Digicen 21R) durante 10 minutos a 5000 rpm a 4 °C en un rotor RT154.

Una vez formada la pastilla celular; se decantó el medio de cultivo dentro de la campana de flujo y se agregaron 9 mL de medio fresco TAP adicionando 1 mL de HCl 1 N. La biomasa se dispersó por agitación lenta inclinando el tubo y pasado 1 minuto se procedió a centrifugar nuevamente durante 10 minutos a 5000 rpm y 4 °C.

Posteriormente se decantó nuevamente el tubo en campana de flujo, y se agregaron 10 mL de medio fresco previamente esterilizado, se dispersó la biomasa por agitación de 1 a 2 minutos; seguidamente se centrifugó a 5000 rpm por 2 minutos (a 4 °C); y se repitió el procedimiento 1 vez más, bajo las mismas condiciones.

Por último, se agregaron 10 mL de medio TAP fresco, se taparon y sellaron los tubos con una película de plástico. Se dejó reposar con un fotoperiodo 12:12 (luz:oscuridad); posteriormente a los 2-3 días se tomó muestra en campana de flujo y se evaluó al microscopio para determinar si el cultivo se encontraba en condiciones para sembrado en cajas Petri.

2.6.2. Crecimiento en placas de Petri

Después de obtener un cultivo menos contaminado con bacterias por el tratamiento ácido, se procedió a cultivar la microalga en cajas Petri con medio TAP y agar. Se preparó y esterilizó medio TAP con agar al 3%; al término del esterilizado, antes de que el medio se enfriara, se procedió a vaciarlo en las cajas Petri dentro de una campana de flujo laminar y se dejó enfriar. Las cajas Petri se inocularon colocando en cada una, de una a dos gotas de las muestras purificadas, extendiéndose con un asa de cultivo previamente esterilizada. Las placas se incubaron de 5 a 7 días a 20 °C, fotoperiodo 12:12 y 30 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se monitoreó el crecimiento de las colonias microalgales.

Las colonias aisladas se cultivaron en matraces de 30 mL con 10 mL de medio de cultivo, durante aproximadamente 8 días.

2.7. Sistemas de cultivo y escalamiento

Los cultivos se revisaron periódicamente con el objetivo de asegurar un cultivo unialgal, y con la mínima cantidad de bacterias asociadas.

2.7.1. Matraces 50 mL

Posteriormente del volumen de 10 mL, se escaló a matraces de 250 mL con 100 mL de medio; siendo el inóculo en este caso, el 10% del volumen total de cultivo. Se colocaron en un agitador orbital Excella E10 a 120 rpm, a una temperatura de 25 °C durante 8 días en fotoperiodo 12:12. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, se realizó el conteo celular para determinar el volumen necesario para obtener una concentración inicial para un siguiente sistema de cultivo de $1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ en fase exponencial.

2.7.2. Matraces Celstir 500 mL

Se estableció como concentración inicial de todos los sistemas de cultivo el valor de $1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$. Una vez alcanzado el volumen de cultivo en la fase exponencial necesaria; se inocularon los matraces Celstir a un volumen de trabajo de 500 mL con medio TAP y se colocaron en una agitadora Wheaton Biostir 6 Model III con sistema de agitación magnético, a 120 rpm. Se realizó la curva de crecimiento durante 15 días con un fotoperiodo de 16:8, luz:oscuridad a 38 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.7.3. Fotobiorreactor (FBR) de 3 L

Se utilizaron botellas PET de 3 litros y se trabajó con un volumen de cultivo de 2 L. La concentración inicial de células fue de 1×10^6 cel mL⁻¹, proveniente del cultivo previo en matraces Celstir en fase exponencial.

La agitación del medio en esta ocasión se realizó por burbujeo de aire (1 vvm), empleando mangueras esterilizadas previamente y filtros de aire. El cultivo se llevó a cabo con una iluminación de $81 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, un fotoperiodo de 16:8, luz:oscuridad y una duración de 15 días.

2.7.4. Fotobiorreactor (FBR) de 20L

El sistema de FBR en el que se trabajó, comprende un tubo de acrílico de 3 mm de espesor, 15 cm de diámetro y 130 cm de altura, con una capacidad de 20 L de volumen total; con una base y tapa del mismo material; acoplados entre sí para evitar la entrada de agentes contaminantes como polvo e insectos. Por la parte superior se encuentra la entrada de aire por medio de un tubo de acrílico hasta el fondo del reactor acoplado a una “cruz” de pvc con orificios de 1mm para la aireación. La aireación fue provista por un compresor MedicAir de 2 Hp y 130 L marca EVANS el cual proporcionó de un aire limpio y seco a los cultivos. El flujo fue regulado con flujómetros Cole-Palmer de 50 Lpm a 1 vvm y filtrado por filtros de algodón previamente esterilizados para retener cualquier partícula que pueda liberar el compresor. La iluminación fue de $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, un fotoperiodo de 16:8 h, luz:oscuridad por dos lámparas fluorescentes situadas una a cada lado del FBR, y se mantuvo a una temperatura 25 °C aproximadamente.

Para el cultivo en FBR's se utilizó un volumen de trabajo de 16 L. Se prepararon soluciones concentradas de las sales que componen el medio de cultivo ARS y se esterilizaron en autoclave; posteriormente en el sistema de cultivo se completó con agua de garrafón hasta los 16 L de volumen de trabajo. El inóculo fue de aproximadamente de una concentración de 20×10^6 cel mL⁻¹ en 790 mL en fase exponencial, para obtener una concentración celular promedio inicial de 1×10^6 cel mL⁻¹. Se tomaron muestras cada 24 h para realizar la curva de crecimiento. Los cultivos se cosecharon en fase estacionaria.

2.8. Cosecha de biomasa

En los cultivos de 500 mL y 2 L de volumen de trabajo, la biomasa se obtuvo mediante sedimentado por 12 h y centrifugado. Las muestras cosechadas se guardaron en tubos de

prolpropileno de rosca de 50 mL, a -20 °C para posteriormente ser secadas en liofilizadora Labconco, Modelo 7753020 a vacío (0.1 bar), -53 °C durante 72 h. En los experimentos de 16 L de cultivo se dejó sedimentar la biomasa durante la noche y posteriormente el sedimento concentrado se centrifugó por 10 min a 5,000 rpm y 4 °C, las muestras cosechadas se guardaron de la misma manera que para cultivos de 0.5 y 2 L.

2.9. Extracción de lípidos

Se evaluaron dos metodologías de extracción, ambas utilizando una mezcla de solventes cloroformo:metanol ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) 2:1 v/v, para realizar una extracción de lípidos totales (polares y no polares). En el primer método se sometió la biomasa a maceración con los solventes; en un segundo método propuesto por Bligh y Dyer (1959) y adaptado para la extracción de compuestos lipídicos de microalgas [77],[78], la biomasa liofilizada se trató con ultrasonido para promover la ruptura celular y la disociación de los lípidos.

2.9.1. Método con maceración

Se pesaron 25 mg de biomasa liofilizada en matraces de 50 mL, se le agregaron 15 mL de la mezcla de solventes cloroformo:metanol (2:1) y se colocaron en un incubador/agitador orbital Zhicheng ZHWY-200B a 140 rpm y 38 °C durante 3 h. El extracto se separó de la biomasa por sedimentación utilizando un embudo de separación. La extracción se realizó 3 veces (Figura 2.3). Los solventes se evaporaron en campana de extracción, dejándolos de un día al otro; una vez secos los extractos, se les aplicó un flujo de nitrógeno para asegurar la completa evaporación de los solventes; posteriormente se determinó el peso seco del extracto lipídico.

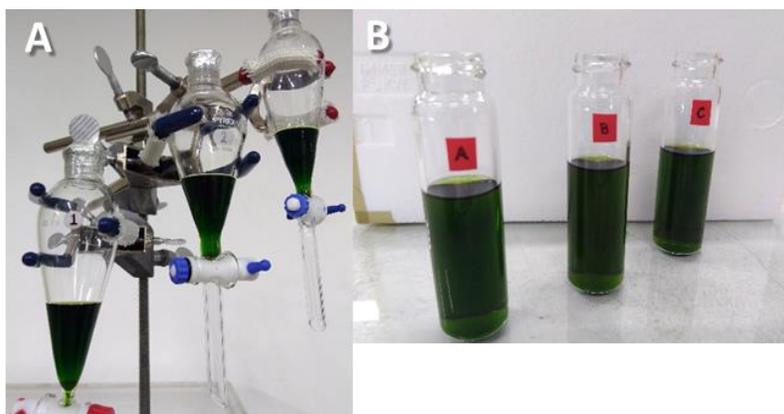


Figura 2.3. Extracción de lípidos por maceración. A) Sedimentación y B) extracto recuperado

2.9.2. Método con ultrasonido.

Se pesaron 25 mg de biomasa de microalgas liofilizada en tubos de vidrio de 15 mL. Se adicionaron 3 mL de la mezcla de solventes cloroformo:metanol (2:1 v/v), se sonicaron en 3 ciclos de 15 minutos en un baño ultrasónico Cole-Palmer (100 W, 42 kHz, Mod. 08895-14), con hielo. Posteriormente se incubaron los tubos por 24 h a 4 °C y protegidos de la luz.

Consecutivamente se volvió a sonicar otros 15 minutos (3 ciclos) en frío y se centrifugaron los tubos a 5000 rpm por 15 min a 4 °C. Se recuperó el extracto con una pipeta Pasteur; pasándolo a un tubo de vidrio de 15 mL. Se agregó 1.5 mL de CHCl₃:CH₃OH (2:1) a la biomasa residual, se agitó en vortex y centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 15 min a 4 °C, recuperando el extracto. Se procedió a evaporar los solventes con nitrógeno y se determinó el peso del extracto.

Posteriormente, para separar lípidos polares de los apolares, se disolvieron los extractos de las dos metodologías en 4 mL de cloroformo y se les agregó 2 mL de agua destilada. Se agitaron con vórtex y de ser necesario se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. Al formarse las dos fases se separó la fase inferior (orgánica), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur. A la fase acuosa se adicionó 1 mL de CHCl₃, se mezcló con vórtex y centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó la fase orgánica con los lípidos, se evaporó el solvente en una campana de extracción con nitrógeno gaseoso.

Para el caso de los FBR de 20 L, la biomasa liofilizada se dividió en dos matraces de 250 mL para hacer mas fácil su manejo; se le adicionó a cada matraz la mezcla de CHCl₃:CH₃OH (2:1) v/v en una relación de 30 mL por 1 g de biomasa. Se les aplicó 3 periodos de ultrasonido de 15 minutos cada uno, en frío. Se dejaron en refrigeración durante 24 horas. El extracto se centrifugó en tubos de centrifuga cónicos de polipropileno de 50mL. Los lavados de la fase orgánica se hicieron en embudos de separación utilizando volúmenes iguales de agua destilada, recuperando la fase orgánica en botellas color ámbar. Los solventes se evaporaron en un evaporador rotatorio Ika® RV10/HB10. Los extractos se recuperaron en frascos previamente lavados y pesados, los remanentes de solvente se eliminaron con flujo de nitrógeno por 20 minutos. Finalmente se pesó el extracto lipídico.

2.10. Cromatografía de capa fina (CCF)

Se utilizó CCF para detectar los compuestos extraídos, utilizando como fase estacionaria una placa de gel de sílice Merck® (Cromatofolios Merck® 60) de 4 cm de ancho por 6 cm de largo.

Las muestras de los extractos se disolvieron en cloroformo para partir de una concentración al 1% aproximadamente. Con ayuda de capilares de vidrio, se aplicó cada una de las muestras en la línea base de la placa, dejando un espacio aproximado de 0.5 cm entre muestra y muestra. La fase móvil consistió en una mezcla de hexano:acetato de etilo:ácido acético 9:1:0.1 (v/v). Las placas desarrolladas se revelaron por inmersión en una solución de ácido fosfomolibdico. Se secó con un papel secante el exceso de solución y la placa se calentó para teñir de azul oscuro las zonas en donde hubo presencia de compuestos. Se utilizó aceite vegetal como referencia para detectar la presencia de triglicéridos.

2.11. Cromatografía de columna por gravedad

Para la separación de los diferentes grupos de lípidos se empleó una columna cromatográfica de 2.5 cm de diámetro y 20 cm de altura. Para la columna se utilizó gel de sílice de 60 Å marca Fluka Analitica de tamaño de partícula de 0.063-0.2 mm. El gel de sílice se mantuvo en hexano durante 12 h y posteriormente se empaquetó en la columna. Para cargar la muestra en la columna se procedió a colocar 0.3 g del extracto lipídico disolvió con cloroformo y 3 g de gel de sílice en un matraz de bola. Se evaporó el solvente mientras se procuraba que el extracto se impregnara uniformemente en el gel de sílice. Posteriormente se cargó la muestra en la columna, cubriéndola con un poco de algodón para evitar el movimiento del gel de sílice al verter la fase móvil (Figura 2.4).

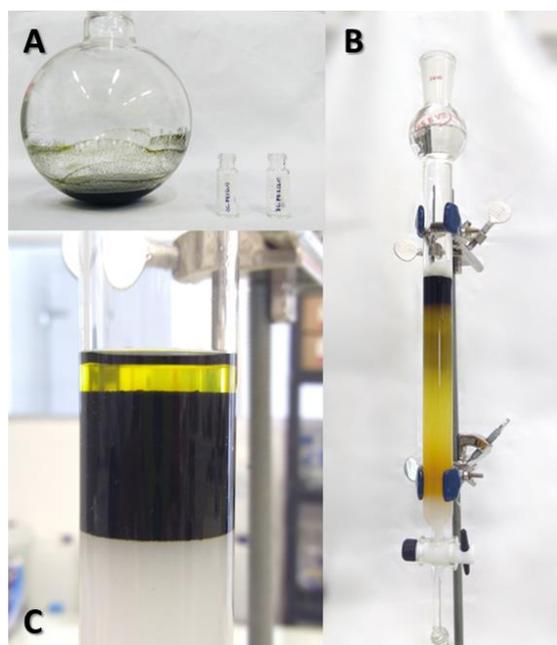


Figura 2.4. Sistema de cromatografía en columna. A) Muestra. B) Muestra en columna. C) Elución de los compuestos

Los compuestos presentes en el extracto se eluyeron utilizando un gradiente de polaridad como se muestra en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Fases móviles de cromatografía en columna por gravedad

FASE MOVIL	PROPORCIÓN (% V/V)
Hexano	100
Hexano : Acetato de etilo	98 : 2
Hexano : Acetato de etilo	90 : 10
Hexano : Acetato de etilo	80 : 20
Hexano : Acetato de etilo	70 : 30
Hexano : Acetato de etilo	50 : 50
Acetato de etilo	100
Metanol	100

Las fracciones se colectaron en tubos de ensayo de 10 mL. Se evaporó la fase móvil en campana de extracción.

Las fracciones obtenidas se evaluaron por CG-EM (a excepción de las muy polares) y en el caso de los triglicéridos, previamente se transesterificaron.

2.12. Transesterificación

La fracción de triglicéridos se diluyó en 1 mL de heptano, del cual se tomaron 250 μL como referencia. Con los 1.5 mL restantes se calculó la cantidad de metóxido, correspondiente al 2% de NaOH y 40% de CH_3OH , en base al peso del extracto. La solución de metóxido se preparó a 37 °C.

En un baño maría a 60 °C y con un agitador magnético se colocó el extracto diluido en heptano, se le agregaron 150 μL de acetato de etilo, posteriormente se adicionaron 100 μL de metóxido. Se tapó el vial y se mantuvo en agitación durante 1.5 h para que se llevara a cabo la reacción de transesterificación.

Una vez que la fracción de triglicéridos fue transesterificada, se procedió a filtrarla en una pipeta Pasteur con gel de sílice tamaño 60 Å y cloroformo como fase móvil, con el fin de eliminar los residuos de glicerol y catalizador.

2.13. Cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-EM)

Las fracciones del extracto lipídico fueron analizadas por cromatografía de gases / espectrometría de masas. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases marca Agilent 7890B GC, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent, modelo 5977B GC/MSD; equipado con una columna marca Agilent Technologies HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 micras).

Se utilizó hidrógeno como gas acarreador en la columna, a un flujo de 1 mL min^{-1} . Las condiciones fueron: una temperatura inicial de 70 °C en isoterma durante 5 minutos, seguida de una rampa de calentamiento de 10 °C min^{-1} hasta 200 °C manteniendo en isoterma durante otros 5 minutos, seguida por una última rampa de 20 °C min^{-1} hasta 290 °C manteniendo en isoterma durante 15 minutos. La temperatura de inyector fue de 300 °C.

2.14. Síntesis del soporte catalítico ZSM-22- $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$

Se partió de una zeolita comercial ZSM-22. Inicialmente, se determinó el rendimiento de alúmina (Al_2O_3) al ser calcinado, para esto se pesaron 5.0427 g del precursor Boehmita ($\text{AlO}(\text{OH})$) y se calcinó a 600 °C durante 4 h con una rampa de calentamiento de 3 °C min^{-1} , se dejó enfriar y se determinó el peso resultante de gama alúmina ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$).

Posteriormente se elaboraron extruidos de la mezcla de zeolita con $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, calculando los gramos de zeolita y de boehmita en una proporción 60:40 (% en peso) respectivamente. Se mezclaron para generar 7 g de soporte. 10% de boehmita se mezcló con una solución de ácido fórmico al 5% (v/v) en agua desionizada; se dejó por varios minutos en agitación hasta formar un gel. Consecutivamente se realizó una mezcla (en seco) del 60% de zeolita y la boehmita restante. Esta mezcla se incorporó poco a poco al gel formado previamente, se agregó por goteo solución de ácido fórmico (5%) y mezcló con espátula hasta homogenizar y obtener una pasta consistente.

Utilizando una jeringa de 20 mL se realizó la extrusión de la pasta, en una superficie limpia y se dejó secar toda la noche (12 h) para luego secar en horno por 6 h a 120 °C. Posteriormente los extruidos se calcinaron a 600 °C por 4 h con una rampa de calentamiento de 1 °C min⁻¹, para convertirse de boehmita a gamma alúmina. Con esta incorporación se consiguió una mejor manipulación del polvo de zeolita minimizando pérdidas significativas y se redujo la exposición a cristales tóxicos del material y aumentó su área específica para lograr una mayor dispersión de la fase activa. Finalmente, el catalizador se trituro y tamizó en malla 40-100 (de tamaño de luz de poro 250 μm -149 μm , respectivamente).

2.15. Impregnación de platino en ZSM-22- $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$

El soporte fue impregnado al 1% en peso de platino (Pt) por el método de humedad incipiente, con una solución de ácido cloroplatínico (Sigma Aldrich 8% w/w en H₂O), mediante la técnica de goteo y mezcla (Figura 2.5). Para establecer esta técnica, se realizó una prueba, determinando el volumen de agua que podía absorber la ZSM22- $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, y de esta manera determinar la cantidad de solución de ácido cloroplatínico necesarios para su impregnación.

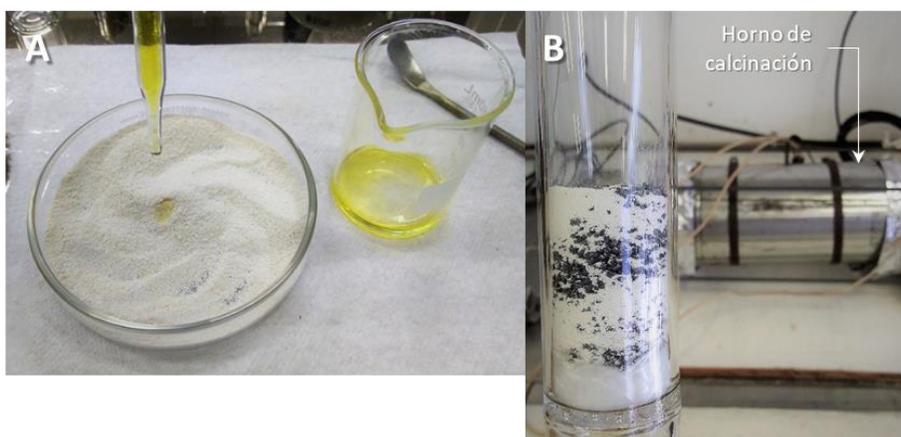


Figura 2.5. Preparación del catalizador A) Impregnación del Pt en la zeolita y B) Calcinación

Una vez impregnado el soporte, se dejó secar durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se calcinó, para esto se colocó con carburandum en un horno de calcinación y con flujo de N_2 de 50 mL min^{-1} se realizó un precalentamiento a una velocidad de $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta alcanzar los $80 \text{ }^\circ\text{C}$ y se mantiene por 2 h. Posteriormente se cambió el gas por O_2 con un flujo de 400 mL min^{-1} y a una velocidad de calentamiento de $0.2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta llegar a los $550 \text{ }^\circ\text{C}$ y se mantuvo durante 2 h para seguidamente enfriar. El catalizador se guardó en atmósfera de N_2 .

2.16. Caracterización del catalizador

El catalizador $Pt/ZSM-22-\gamma-Al_2O_3$ fue evaluado mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y por espectroscopia de energía dispersiva (EDS), utilizando un microscopio electrónico de barrido de alta resolución marca JEOL, modelo JSM-6360 LV; para registrar su estructura y composición química elemental de la superficie del catalizador

A su vez también se evaluó por difracción de rayos X (DRX) para identificar las fases cristalinas presentes en su estructura y por fisisorción de nitrógeno por el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET) análisis para determinar el área superficial, el tamaño y volumen de poro.

2.16.1. Microscopía electrónica de barrido

Para este análisis, se deshidrató la muestra de catalizador ($100 \text{ }^\circ\text{C } 12 \text{ h}^{-1}$) y se utilizó un microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM-6360 LV de alta resolución.

La muestra se pulverizó y se colocó en una película adherente de carbón sobre un portaobjetos metálico; se le dio un pretratamiento.

2.16.2. Difracción de rayos X

Se utilizó un equipo DRX Bruker D2 Phaser XE-T de 2ª generación utilizando un ánodo de cobre con radiación $\text{CuK}\alpha$ a una longitud de onda de 1.54060 Å. La muestra de catalizador ya tamizado (40/100) fue previamente deshidratada (100 °C 12 h⁻¹) y colocada en una línea sobre el soporte del equipo, ayudándose con un cubreobjetos para dejar una línea uniforme y continua. **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** El difractograma corrió en un intervalo 2θ de 5 a 60°, con tiempo de paso de 0.3 s y tamaño de paso de 0.02°.

2.16.3. Fisisorción de nitrógeno

Para el análisis de la determinación del área superficial por el método BET, se utilizó un equipo Quantachrome Instruments, modelo NOVA 2200e Surface Area. Previo al análisis la muestra de catalizador fue deshidratada (100 °C 12 h⁻¹). El análisis consistió en dos partes, una etapa de desgasificado en vacío durante 16h a una temperatura de 270 °C; y otra etapa donde se inyectó N_2 a la celda y por el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET) se estimó el área superficial. Por el método de Barret-Joyner-Halenda (BJH) se determinaron el tamaño y volumen de poro; ambos a una presión relativa (P/Po) cercana a 1.

2.17. Reacción de Hidrodesoxigenación

Las reacciones de catálisis se llevaron a cabo en un reactor de lecho fijo Microactivity-Reference marca PID Eng & Tech equipado con una pantalla y una computadora para monitoreo y control de los parámetros de reacción. El reactor es alimentado con una bomba de HPLC marca Gilson Mod. 307v3.00 que soporta 400 bar y un flujo de hasta 5 mL/min (Figura 2.6).

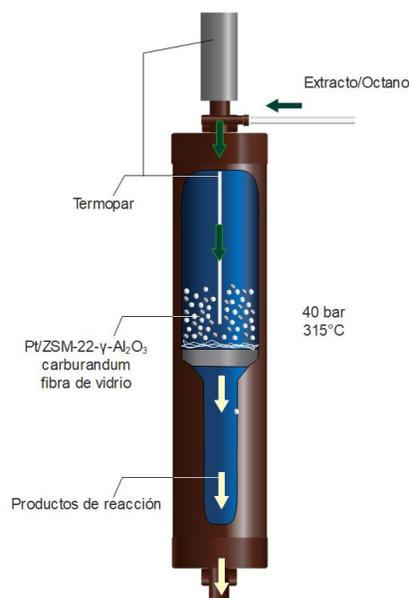


Figura 2.6. Diagrama del reactor de lecho fijo

Para llevar a cabo las reacciones catalíticas, se colocó un soporte de fibra de vidrio en el reactor, seguido de la mezcla del catalizador Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃ con carburo de silicio (SiC), en una relación w/w de 1:0.17 catalizador/SiC; ambos previamente triturados y tamizados con malla 40/100. El extracto lipídico fue diluido en octano, luego la solución se centrifugó y filtró para evitar bloqueos en las líneas del reactor.

2.17.1. Parámetros de reacción

La activación del catalizador se realizó con un flujo constante de 50 mL min⁻¹ de hidrógeno (pureza 99.99%) como fase móvil, a una presión de 25 bar y a 400 °C, durante 190 min, este paso se realiza cada vez que se carga el reactor con el catalizador (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Parámetros de activación y reacción

	ACTIVACIÓN	REACCIÓN
Flujo H - mL min ⁻¹	50	55
Presión - bar	25	40
Rampa - bar	5	5
Temperatura - °C	400	315
Rampa - °C	5	5
Tiempo - h	2	3

Condiciones de Reacción

Una vez que se realizó la activación del catalizador; la temperatura y presión del reactor se fijaron a 315 °C y 40 bar. El flujo de hidrógeno se elevó a 55 mL min⁻¹. Cuando las condiciones se encontraron estables, se inició la alimentación de la muestra a un flujo de 0.25 mL·min⁻¹ durante 3 horas. La presión varió de acuerdo con la naturaleza de la mezcla de reacción, entre 50 y 72 bar. A partir de que cae la primera gota de producto líquido de reacción, (alrededor de 30-35 min del inicio de inyección de la muestra) se inicia la cuenta de tiempo para la toma de muestras. El tiempo total de reacción fue de 3 h y se tomaron muestras cada hora.

2.18. Reacciones

Se realizó el tratamiento de hidrogenación a 3 estándares de naturaleza lipídica, como modelos de los grupos de compuestos presentes en el extracto microalgal: heptadecano (hidrocarburo), triestearina (triglicérido) y colesterol (triterpeno), con el fin de tener información de las transformaciones moleculares que cada tipo de lípido sufre durante la reacción.

Tanto los estándares como el extracto microalgal se diluyeron en octano (Sigma Aldrich, 99%) para ser inyectados en el reactor. Se prepararon soluciones al 10% de heptadecano (v/v) y triestearina (w/v) en octano. Con el colesterol, la solución fue al 3% w/v debido a la poca miscibilidad del estándar en el solvente. Para disolver los dos últimos estándares se calentó la mezcla a 30 °C. El extracto microalgal se diluyó en octano en una concentración del 1.75% w/v (2 g de extracto en 130 mL de octano).

Para cada estándar y para el extracto microalgal, se calcularon las cantidades de carburo de silicio (SiC) y catalizador a utilizar; así como el valor de flujo másico para tener la misma velocidad espacial específica (WHSV) de 5 h⁻¹ para todas las reacciones. Los productos de las reacciones del hidrotreatmento fueron analizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas bajo las mismas condiciones indicadas anteriormente.

CAPITULO 3

PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL Y EXTRACCIÓN LIPIDICA

En este capítulo se presentan los resultados y discusión de la obtención de la biomasa microalgal de *Scenedesmus obliquus* en los diferentes sistemas de cultivo, así como la determinación del perfil de lípidos producidos.

3.1. Clasificación de *Scenedesmus obliquus*

Dentro de la revisión bibliográfica de la especie *Scenedesmus obliquus*, se reportó por Guiry y Guiry en el 2018, que la nomenclatura de *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing ha cambiado a *Tetradismus obliquus* (Turpin) M.J. Wynne [20].

En 2011 Tsarenko y John discutieron las relaciones taxonómicas entre los géneros *Acutodesmus*, *Desmodesmus* y *Scenedesmus*. Tanto *Desmodesmus* como *Acutodesmus* fueron inicialmente un subgénero de *Scenedesmus*; posteriormente ambos se elevaron a nivel de género. Mediante el análisis de las secuencias del ITS-2 del ADN ribosomal An y colaboradores en 1999, elevaron *Desmodesmus* a nivel de género. De igual manera el grupo *Acutodesmus* fue validado en 1978 como subgénero por Hegewald [79]; y en 2001 a nivel de género por Tsarenko [80]. Se reclasificaron un total de 19 especies y taxones infraespecíficos, reconocidos dentro de *Acutodesmus*, entre ellas *Scenedesmus obliquus*. [20],[81]

El hecho de que algunas especies (entre ellos *A. dimorphus* y *A. obliquus*) de *Acutodesmus* se están estudiando por su potencial para biocombustibles y la producción de energía renovable, impulsó el motivo para clarificar la nomenclatura de este grupo. *Tetradismus* fue establecido como género monotípico por G. M. Smith (1913) al describir a la especie *Tetradismus wisconsinensis* (G.M. Smith), y varios taxones tuvieron que ser transferidos a *Tetradismus* sp. [20].

AlgaBase reconoce desde 2015 a *Tetradismus obliquus* (Turpin) M.J. Wynne como el nombre taxonómico aceptado actualmente y *Scenedesmus obliquus* como una sinonimia de la especie [20],[81].

Autores como Di Caprio et al. (2018), Ismagulova et al. (2018), Scherbakov et al. (2018), Castillo et al. (2017), Carreres et al. (2017), Buono et al. (2016), entre otros, ya reconocen y reportan a *Scenedesmus obliquus* como *Tetradesmus obliquus* [82-[87]

3.2. Reacondicionamiento de la cepa en medio TAP

La muestra de la cepa SC01 mostró la presencia de contaminación (principalmente bacterias) y restos celulares (Figura 3.1.A); por lo que se procedió a una descontaminación del cultivo proporcionado mediante un tratamiento ácido. En la Figura 3.1: se puede observar que la cepa resistió el tratamiento y la contaminación bacteriana disminuyó drásticamente.

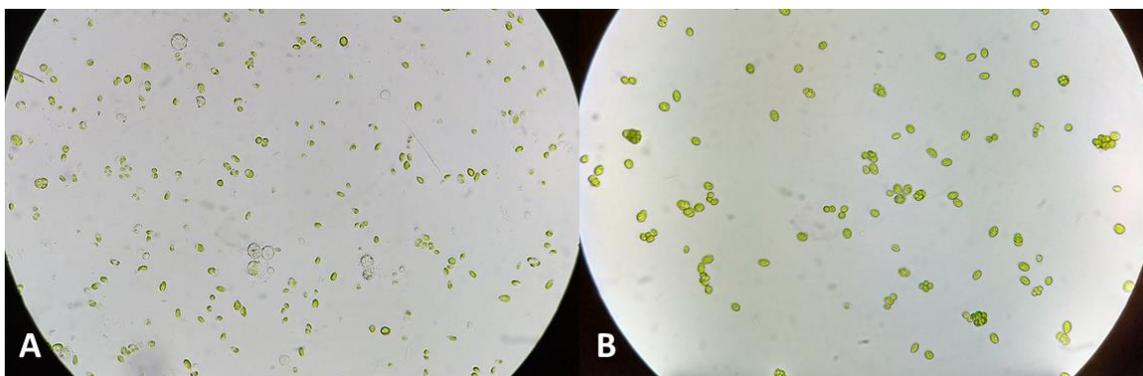


Figura 3.1. Tratamiento ácido del cultivo de SC01. Observación al microscopio a 40x antes (A) y después (B) del tratamiento

Posteriormente a los lavados con HCl, se realizaron cultivos en placa de agar preparada con medio TAP, método que además de dar buenos resultados para la mayoría de las especies clorofitas, se emplea para purificar cultivos contaminados con otros organismos. Después de incubar por 8 días se pudo observar el crecimiento de colonias aisladas (Figura 3.2) a partir de las cuales se realizaron nuevos cultivos en matraces con medio TAP.

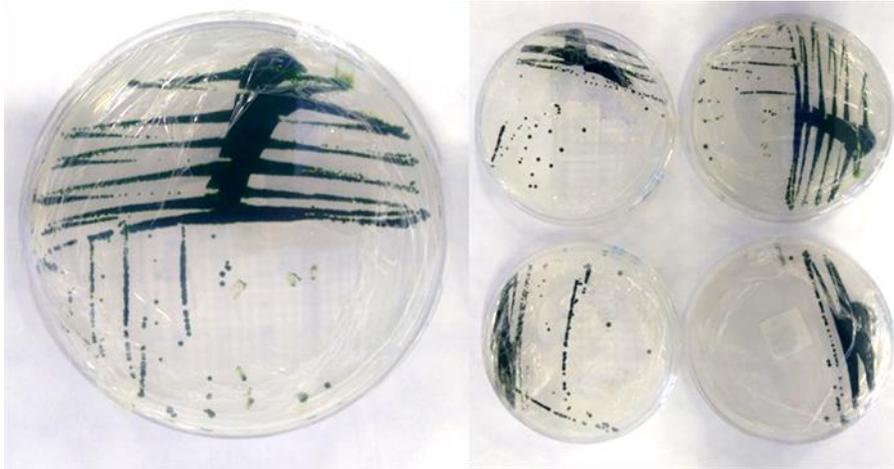


Figura 3.2. Cultivo en placa de agar de *Scenedesmus obliquus* posterior al tratamiento ácido

Después de incubar los cultivos en medio líquido (Figura 3.2), se examinaron y se confirmó que la carga bacteriana se redujo casi en su totalidad. Las células microalgales presentaron mayor tamaño, un tanto alargadas y mostraron algunas formaciones en cenobios de 2 y 4 células. Estos cultivos se utilizaron como inóculo para iniciar el escalamiento de los cultivos a matraces Celstir de 500 mL, botellas de 2 L y finalmente, los fotobiorreactores de 20 L.

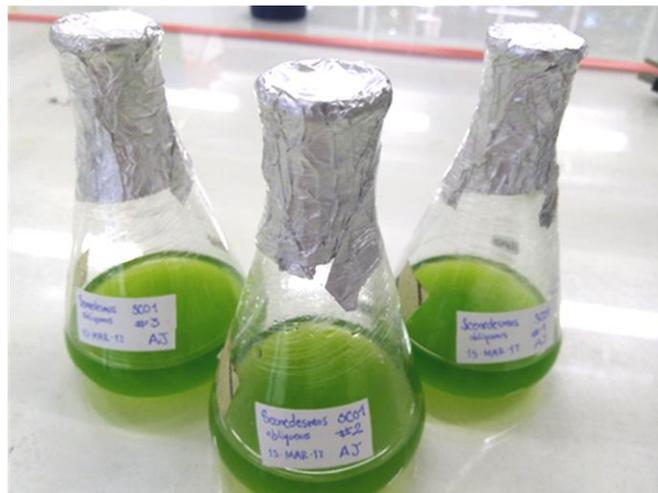


Figura 3.3. Cultivo en matraces de 150 mL de SCO1 después de la limpieza con HCl 1 N

3.3. Cultivos en matraz Celstir de 500 mL en medio TAP.

Con el fin de establecer las etapas de la curva de crecimiento microalgal de *S. obliquus*, y para generar el inoculo adecuado se inició el escalamiento de los cultivos en matraces tipo Celstir a 500 mL de volumen de cultivo (Figura 3.4). El desarrollo del cultivo se llevó a cabo sin contaminación.



Figura 3.4. Cultivo en celstir de 500 mL

En la Figura 3.5 se puede observar la curva de crecimiento de *S. obliquus* en medio TAP, en donde la microalga presentó una fase de adaptación de 24 horas seguida de una fase de crecimiento exponencial de 3 días y a partir del 4º día permaneció en fase estacionaria, hasta el día 15 de cultivo y se logró una concentración de 25×10^6 cel mL⁻¹.

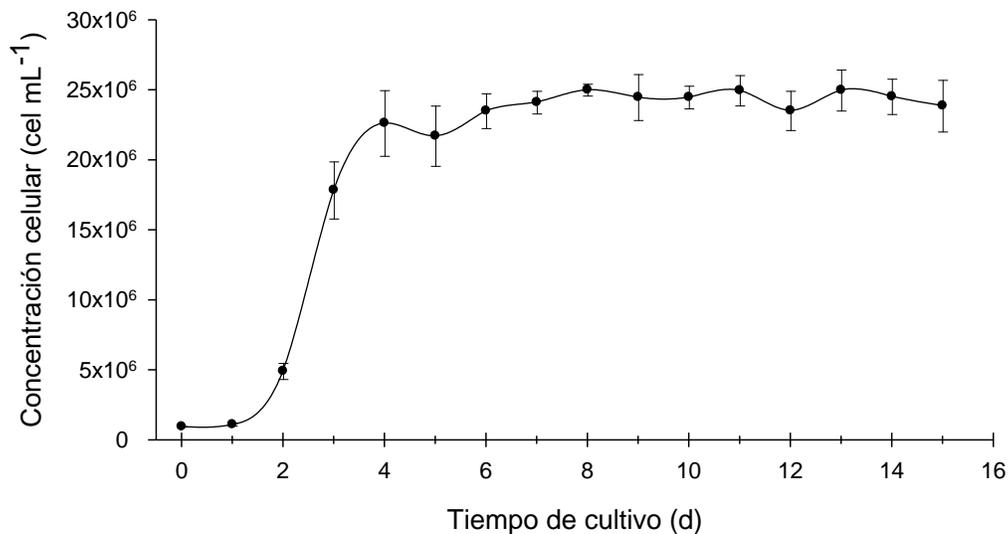


Figura 3.5. Curva de crecimiento celular en matraz Celstir de 500 mL en medio TAP

Otros cultivos realizados en medio TAP son los reportados por Nanduca en 2015 y Serrano-Vásquez en 2017 sus trabajos abarcaron cultivos en sistemas Celstir [88],[89]. Nanduca (2015) realizó cultivos de *Scenedesmus* sp. reportando un periodo de adaptación de 2 días, seguido de 2 días de fase exponencial y una fase estacionaria variable de 10 días; logrando una concentración final de 12.5×10^6 cel mL⁻¹. En el caso de Serrano-Vásquez (2017) trabajó con *Coelastrum* sp., otra especie de la familia Scenedesmaceae y presenta tanto una fase de adaptación como de crecimiento exponencial de 1 día, estableciendo una fase estacionaria a partir desde el día 2 y logrando una concentración celular de 9.7×10^6 cel mL⁻¹. Ambos autores inician con alrededor de 5×10^5 cel mL⁻¹, que representa el 50% de la concentración inicial que se utilizó el presente trabajo. De acuerdo con lo reportado y los resultados presentados en este proyecto; la concentración celular inicial de un cultivo microalgal puede determinar la concentración final de este a las mismas condiciones de cultivo.

3.4. Cultivos en botellas PET de 3L.

Para generar el inóculo adaptado a los sistemas de 20 L, se realizaron cultivos en botellas de PET de 3 L utilizando un volumen de trabajo de 2 L, utilizando primeramente medio de cultivo TAP (como referencia, Figura 3.6.A) y posteriormente Agua Residual Sintética enriquecida con melaza como fuente de carbono, (Figura 3.6.B).



Figura 3.6. Fotobiorreactores de 2L TAP (A) y ARS/melaza (B)

Los cultivos en FBR de 2 L con medio de cultivo TAP presentaron un crecimiento similar al obtenido en los matraces Celstir de 500 mL (Figura 3.7). Se observó una fase de adaptación de 1 día y una fase de crecimiento exponencial de 2 días; permaneciendo en

fase estacionaria hasta el final del cultivo; obteniendo 36×10^6 cel mL^{-1} . El pH aumentó ligeramente de 7 a 8.5 durante la fase de crecimiento exponencial y se mantuvo sin cambios hasta el final del cultivo.

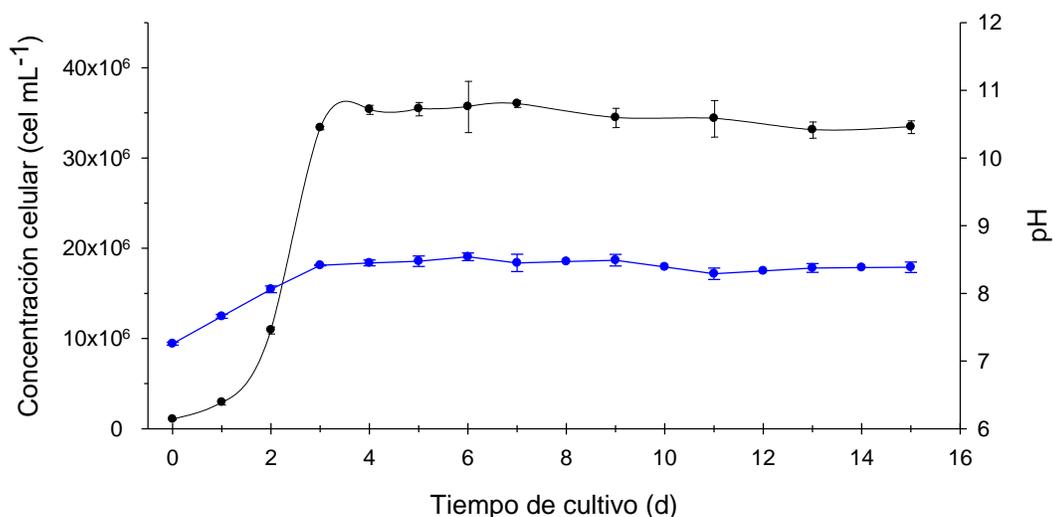


Figura 3.7. Curva de crecimiento celular en sistema FBR 2L con TAP. En azul la curva de pH

Se presenta una variación en la concentración celular entre FBRs y matraces Celstir ambos con medio TAP siendo 10×10^6 cel mL^{-1} mayor en FBR. Una de las principales diferencias entre ambos cultivos y a la cual se le atribuye la diferencia en concentración celular, es el método de agitación utilizado; siendo en matraces Celstir por agitación magnética y por aireación en FBRs. La inyección de aire en fotobiorreactores además de ser el método más utilizado y económico para la distribución homogénea del medio de cultivo, es portador de la mezcla de gases presentes en el ambiente entre ellos el CO_2 .

En promedio el CO_2 tiene una concentración en el aire de 405 ppm y se ha reportado que el suplemento de CO_2 ya sea suministrado directamente o mezclado con el aire utilizado para la aireación, aumenta en gran cantidad la productividad de los cultivos de microalgas llegando a duplicar la biomasa. El CO_2 es la fuente de carbono, uno de los macronutrientes más importantes para el crecimiento microalgal que llega a constituir el 50% de la biomasa. Es fundamental para el proceso de fotosíntesis y generación de biomasa, y ayuda a mantener el pH de los cultivos alrededor de 7.5 [33],[90].

Por otro lado está ampliamente reportado que *S. obliquus* presenta la capacidad de aprovechar el CO_2 como fuente de carbono inorgánica; y ha sido propuesta para el

secuestro/fijación de dicho gas en cultivos con fotobiorreactores y aireación, utilizando aire enriquecido con CO₂ [90],[91].

Por otra parte, los cultivos con ARS-Melaza (Figura 3.8) no presentaron el crecimiento esperado. Desde el primer día inició la fase de crecimiento exponencial, la cual duró 24 h, llegando a la concentración celular de 4x10⁶ cel mL⁻¹, la cual se mantuvo constante durante los siguientes 5 días, que es cuando se determinó concluir el cultivo, porque se observó la aparición de esferas pequeñas que al microscopio se observaron a modo de un entramado filamentoso muy parecido al micelio de un hongo. El pH disminuyó durante la fase de crecimiento exponencial de 7 hasta un valor de 3, y se mantuvo constante. Es posible que esto haya generado las condiciones ideales para el desarrollo de hongos.

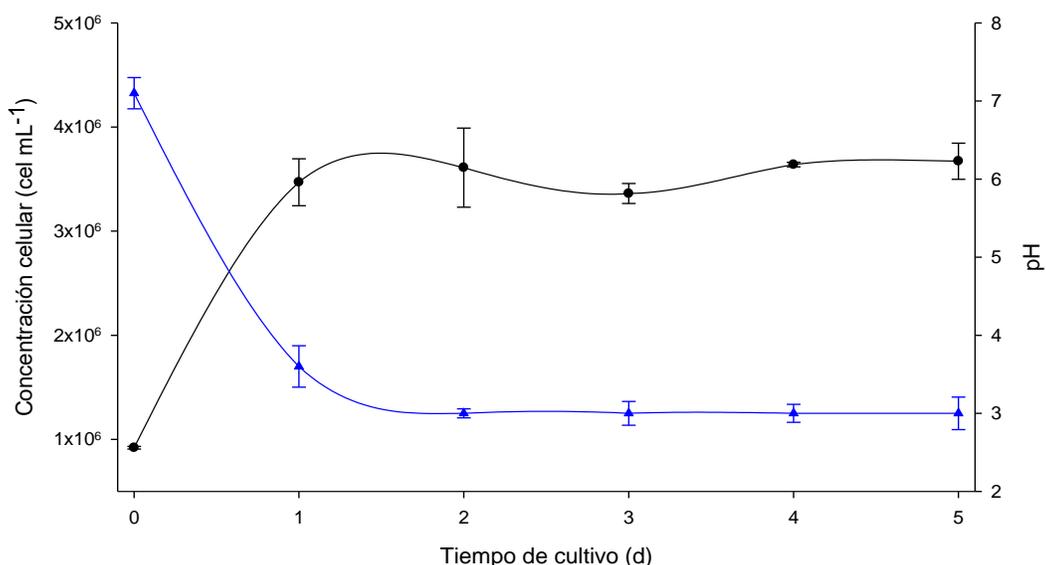


Figura 3.8. Curva de crecimiento celular en sistema FBR 2L con ARS/melaza. Concentración celular (●), pH (línea azul)

La formulación del ARS/melaza utilizada en este trabajo, tiene un contenido de carbono de 3.1 g L⁻¹ de azúcares, en comparación con 0.42 g L⁻¹ que contiene el medio TAP. Tomando en cuenta que no todos los azúcares están disponibles para el aprovechamiento por parte de las microalgas, así como el pH de 3; existe la oportunidad de proliferación de hongos en el medio, así como de bacterias. Según Fajardo y Sarmiento en 2007, la melaza constituye un excelente medio de crecimiento para microorganismos como levaduras, hongos y bacterias [92]. Así también, mencionan que hay una considerable presencia de microorganismos mesófilos y termófilos dentro de las melazas. Es por ello por lo que se

considera que la melaza es la principal causa de la proliferación de contaminación en los reactores.

Se ha reportado que la asimilación de amonio por las células microalgales es acompañada de la producción de iones H^+ , provocando un fuerte descenso del pH en el medio, limitando el crecimiento y promoviendo la muerte celular, dependiendo de la especie [19],[33],[93]. El descenso en el pH del medio de cultivo ARS/melaza se debió a que no se adicionó la solución reguladora como en el caso del medio TAP.

Para contrarrestar el efecto que pueda tener la acidificación del medio por el metabolismo celular; se realizó un experimento agregando 2.4 g de Tris-Base (la misma concentración que tiene el medio TAP), para generar una solución amortiguadora en conjunto con los fosfatos del ARS y reducir los cambios de pH en el medio de cultivo.

Con la solución reguladora en el medio ARS/melaza, se logró mantener un pH adecuado para el desarrollo del cultivo celular en sistemas de FBR de 2 L. Aunque el valor de pH disminuyó ligeramente por debajo de 7, no fue importante como para impedir el crecimiento celular (Figura 3.9). La concentración celular final fue de 12×10^6 cel mL^{-1} , tres veces más que lo obtenido cuando el medio no tuvo solución reguladora. Aun con esta mejora, se obtuvo la mitad de la concentración celular final que la obtenida en medio TAP.

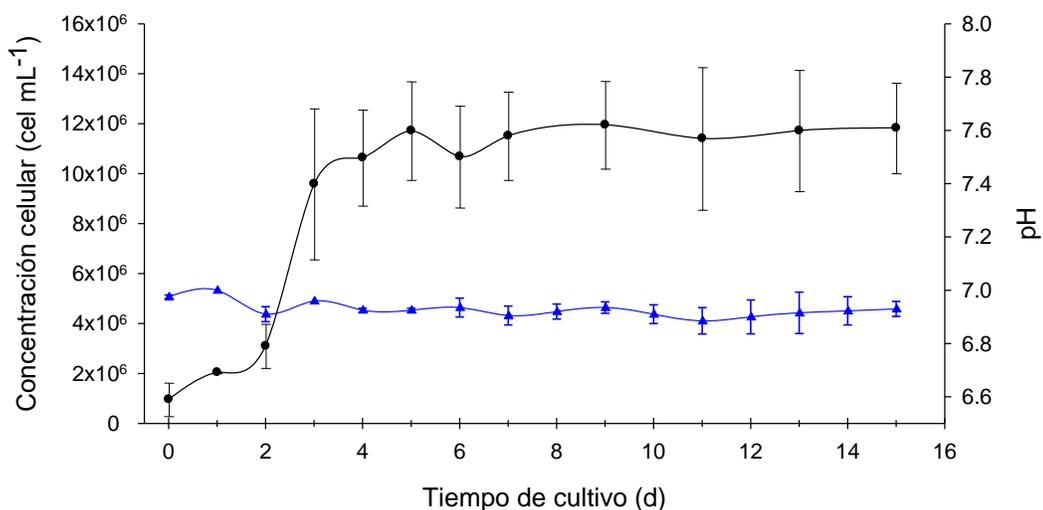


Figura 3.9. Curva de crecimiento celular en sistema FBR 2L con ARS/melaza-TRIS. En azul la curva de pH

Con la falta de crecimiento y la contaminación constante de los cultivos, se decidió probar otra fuente de N para el desarrollo de la biomasa microalgal en sistemas de 20L.

Se sabe que las microalgas asimilan mejor el amonio como fuente de N en comparación con los nitratos o nitritos. Esto debido a que la incorporación de una forma más oxidada de nitrógeno (nitrato) debe ser reducida a nitrito y posteriormente a amonio¹, antes de que pueda ser asimilado y metabolizado en moléculas orgánicas. Este proceso requiere mayor inversión de energía por parte de la célula, mientras que el amonio es un compuesto reducido y se asimila más fácilmente para la síntesis de moléculas orgánicas [14],[33],[93],[94].

Se decidió probar acetato de amonio como fuente de N y al mismo tiempo de C orgánico, eliminando así la necesidad de utilizar melaza y dejar de lado los problemas con la acidificación. Se realizaron los cálculos en peso para que la concentración de N fuese la misma que presenta el medio TAP.

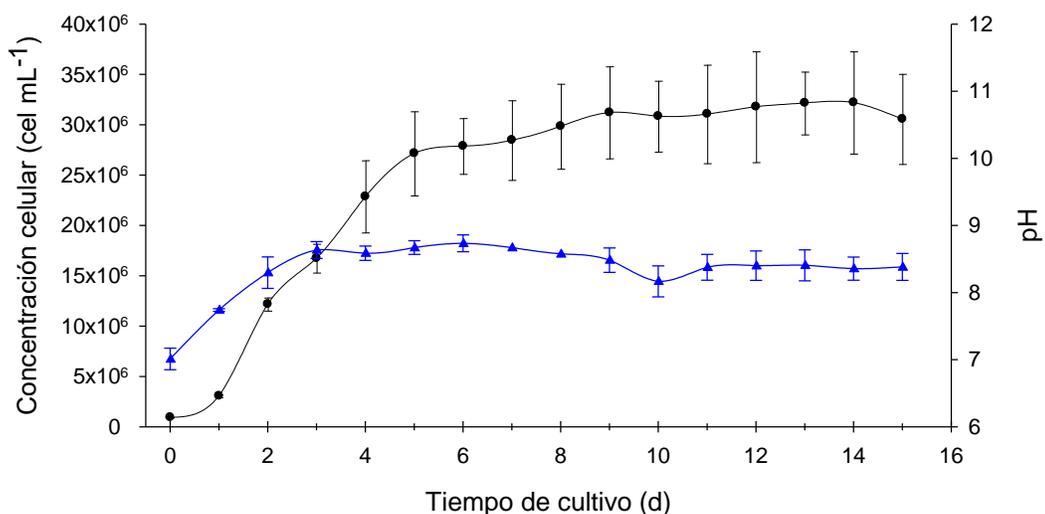


Figura 3.10. Curva de crecimiento celular en sistema FBR 2L con medio ARS/acetato de amonio, en azul se presentan los cambios de pH en el cultivo

En la Figura 3.10 se muestra la curva de crecimiento de los cultivos en 2L con acetato de amonio, que mostraron un mejor crecimiento celular con una fase de adaptación de un día

¹ La asimilación del nitrato ocurre en dos pasos catalizados por las enzimas nitrato reductasa (NR) que metaboliza el nitrato a nitrito en el citoplasma celular, y la nitrito reductasa (NiR) de nitrito a amonio, en el cloroplasto.

y 4 días de crecimiento exponencial, estableciendo una fase estacionaria a partir del día 5 y logrando 33×10^6 cel mL⁻¹. Pese a una ligera alcalinización del medio de cultivo, se obtuvo una concentración celular similar a la obtenida por los cultivos con medio TAP (36×10^6 cel mL⁻¹), y más del doble de la concentración lograda con melaza y TRIS-Base (11×10^6 cel mL⁻¹); por lo que se optó que el medio con acetato de amonio se escalara a los sistemas de 20 L.

3.5. Cultivos en columnas de burbujeo de 20 L

Tomando en cuenta que en las curvas de crecimiento en sistemas de 2 L con ARS/acetato de amonio la fase exponencial de crecimiento termina al día 5 de cultivo; se estimó que en las columnas de burbujeo de 20 L de capacidad y 16 L de volumen de cultivo, terminaría en el mismo tiempo y se optó por mantener el cultivo en fase estacionaria por otros 4 días más; para luego cosechar la biomasa y recuperar la fracción lipídica. En la Figura 3.11 se puede observar la curva de crecimiento de la microalga en el medio ARS/acetato de amonio.

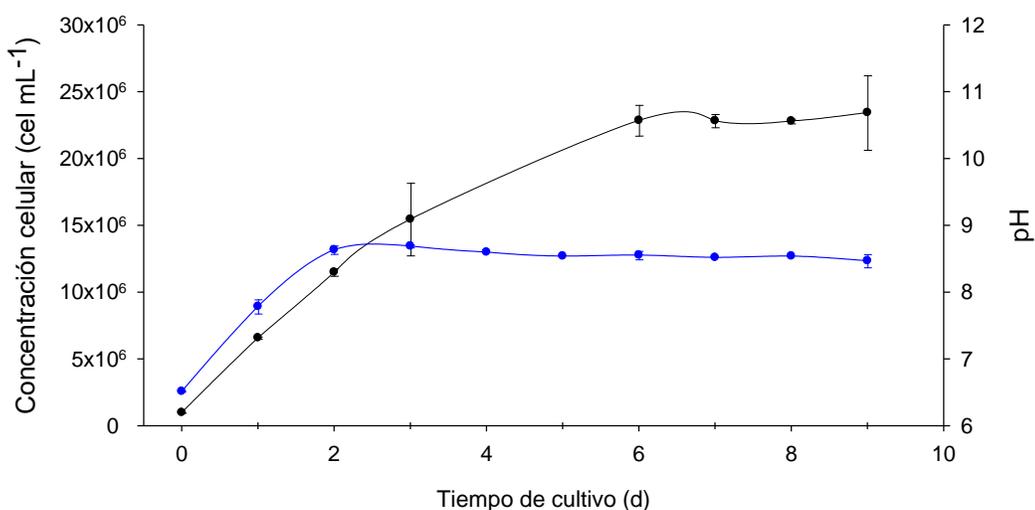


Figura 3.11. Curva de crecimiento celular en sistema FBR 20L con medio ARS/acetato de amonio, en azul se presentan los cambios de pH en el cultivo

El crecimiento de *S. obliquus* en ARS adicionada con acetato de amonio, logra 23×10^6 cel mL⁻¹ en una curva de crecimiento donde no se diferencia una fase de adaptación y aparentemente desarrolla 6 días de crecimiento acelerado. Se registró un peso seco de biomasa de 0.394 g L^{-1} de cultivo promedio, lo que representa unos $6.31 \pm 0.12 \text{ g}$ de biomasa seca generado por fotobiorreactor a los 9 días de cultivo.

3.6. Extracción de lípidos microalgales

El uso de un sistema de solventes polar/no polar asegura la extracción de los lípidos totales. Un solvente apolar, eluye los lípidos neutros (ácidos grasos, ceras, esteroides), y el solvente con mayor polaridad, disuelve los lípidos polares (fosfolípidos, esfingolípidos y gliceroglucolípidos) que se encuentren en la muestra [77],[95],[97]. En este trabajo se optó por una metodología basada en la mezcla cloroformo:metanol 2:1 v/v, dando preferencia a los lípidos neutros, y evaluando entre una extracción asistida por maceración y sonicado.

Una vez realizadas las extracciones de la fracción lipídica, utilizando las dos metodologías propuestas (Figura 3.12), se procedió al secado de los extractos con flujo de nitrógeno, para obtener el peso constante de cada extracto, obteniendo un peso similar del extracto para ambas metodologías (Tabla 3.1).

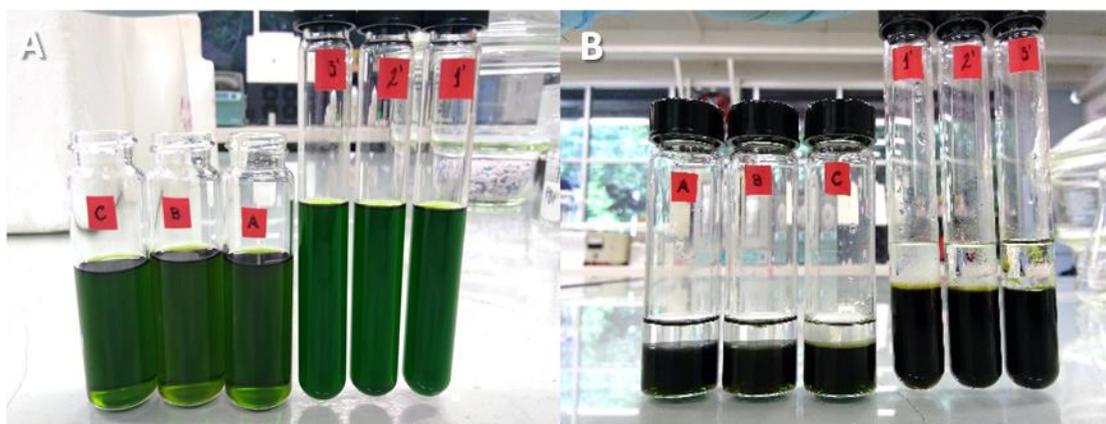


Figura 3.12. A. Extractos lipídicos viales (A, B, C) maceración; tubos (1', 2', 3') ultrasonido.
B. Separación de la fase acuosa y orgánica (cloroformo:lípidos)

En la Tabla 3.1 comparamos la extracción de ambas metodologías, se presenta que la extracción asistida por sonicado representa el 25.2% del peso de la biomasa total con 6.3 ± 0.1 mg, mientras que la extracción asistida con maceración extrae el 23.9% de peso de extracto lipídico con 6.0 ± 0.4 mg.

Tabla 3.1. Diferencias en peso de las metodologías de extracción

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	BIOMASA (mg)	EXTRACTO TOTAL (mg)	CONTENIDO LIPIDICO (%)
Sonicado	25	6.3 ± 0.1	25.2
Maceración	25	6.0 ± 0.4	23.9

Se registró una mayor cantidad promedio de extracto en la metodología asistida por ultrasonido de 6.3 ± 0.1 mg, y una menor de 6.0 ± 0.4 mg para la extracción por macerado. Aunque presentan valores promedios diferentes las desviaciones estándar nos indican que no hay diferencia significativa entre ambas metodologías. Se logró obtener con el proceso de sonicado un 25.2% (± 0.4) de extracto lipídico en peso seco contra 23.9% (± 1.9) de extracto por maceración.

Para el caso de los cultivos en FBRs a 9 días de cultivo se obtuvo 6.31 g de biomasa promedio por reactor, una vez realizado el método de extracción asistido por ultrasonido se logró obtener un peso promedio de extracto lipídico de 1.16 g por cada FBR, lo que representa el 18.44% de peso seco de la biomasa generada. Este extracto servirá para las pruebas de hidrodeshidrogenación.

3.7. Cromatografía de capa fina CCF de los extractos por macerado y ultrasonido

Los extractos se disolvieron en 0.6 mL de cloroformo para partir de una concentración al 1% aproximadamente. Los perfiles de compuestos en los extractos obtenidos por las dos metodologías resultaron similares, como se muestra en la Figura 3.13.

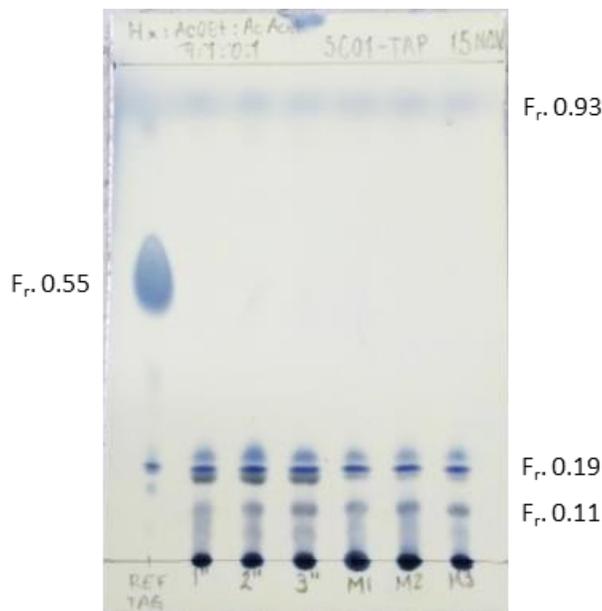


Figura 3.13. CCF de los extractos obtenidos por sonication (n'') y obtenidos por maceración (M)

Se observa la presencia de una mancha con un factor de retención (Rf en inglés) de 0.93, que en trabajos anteriores se ha visto que corresponde a compuestos de tipo alcanos, de baja polaridad. Las manchas con Fr de 0.11 y 0.19 corresponden en su mayoría a compuestos de tipo esteroides, alcoholes grasos y terpenos. Las manchas que aparecen en el punto de aplicación corresponden a los fosfolípidos, los compuestos más polares presentes en los extractos [89]. La referencia que se utilizó fue aceite vegetal comercial, y muestra una mancha principal con un Fr de 0.55 correspondiente a triglicéridos. La ausencia de manchas con el mismo Fr en los extractos puede indicar que no contienen triglicéridos o que están en concentraciones pequeñas que no pueden ser detectadas por esta técnica. Dadas las similitudes de las cantidades de extracto y de los perfiles cromatográficos de los extractos obtenidos por las dos técnicas de extracción, las extracciones de lípidos en este trabajo se realizaron con la asistencia de ultrasonido, por tener un porcentaje mayor de extracción de lípidos totales, ser más rápida y utilizar menos solventes.

3.8. Cromatografía Flash de extracto por sonicado

Se realizó una partición del extracto microalgal en un cromatógrafo Isolera™ Prime marca Biotage; esto para evaluar el proceso de cromatografía flash. El extracto obtenido con sonicado No.2, se cargó en un cartucho ZIP de fase normal de 50 g y se obtuvieron 15 fracciones (Figura 3.14). Las fracciones se eluyeron en 100% hexano (fracciones 1-4), posteriormente 90:10 hexano:acetato de etilo (fracciones 5-8); en proporción 80:20 (hexano:acetato de etilo) se eluyeron las fracciones 9-10. En proporción 7:3 las fracciones 11-12; 100% acetato de etilo las fracciones 13-14 y con 100% metanol salió la fracción 15 (Figura 3.14).

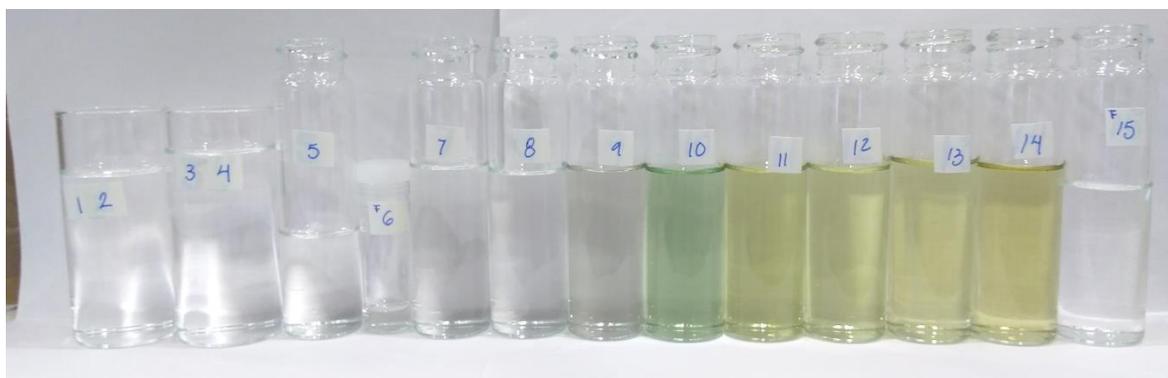


Figura 3.14. Eluciones de la cromatografía en Isolera Prime de la muestra 2"

En la Figura 3.15 se muestra la cromatografía de capa fina de las fracciones obtenidas. En el rectángulo azul se enmarca la referencia de triglicéridos y la muestra 2" en crudo. En las fracciones siguientes aparecieron los demás eluatos o compuestos que constituyen el extracto crudo. Se registró la presencia de triglicéridos con Fr de 0.55 y compuestos de tipo alcanos de menor polaridad con Fr de 0.86, en la fracción 7 (Figura 3.15).

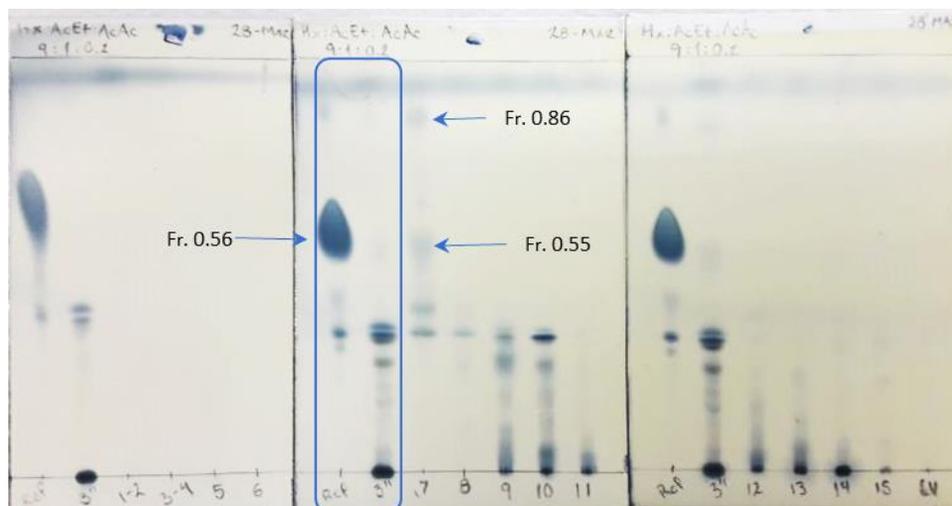


Figura 3.15. Cromatografía de capa fina de las fracciones del extracto microalgal clave 2'' obtenidas por cromatografía flash

3.9. Cromatografía de capa fina del extracto del fotobiorreactor de 20 L

250 mg de extracto crudo obtenido de la biomasa cultivada en fotobiorreactor de 20 L fue fraccionado por cromatografía en columna por gravedad como se indicó en el Capítulo 2. En la Figura 3.16 se muestra cómo se constituyeron 9 fracciones a partir de las muestras que salieron de la columna.

Posterior al separado de las fracciones, se llevó a cabo la transesterificación de la fracción correspondiente a los triacilglicéridos (TAG). En la fracción 2 (F2) se observó una mancha con un Fr cercano a la referencia de triglicéridos, por lo que se transesterificó para posteriormente ser analizada por CG-EM.

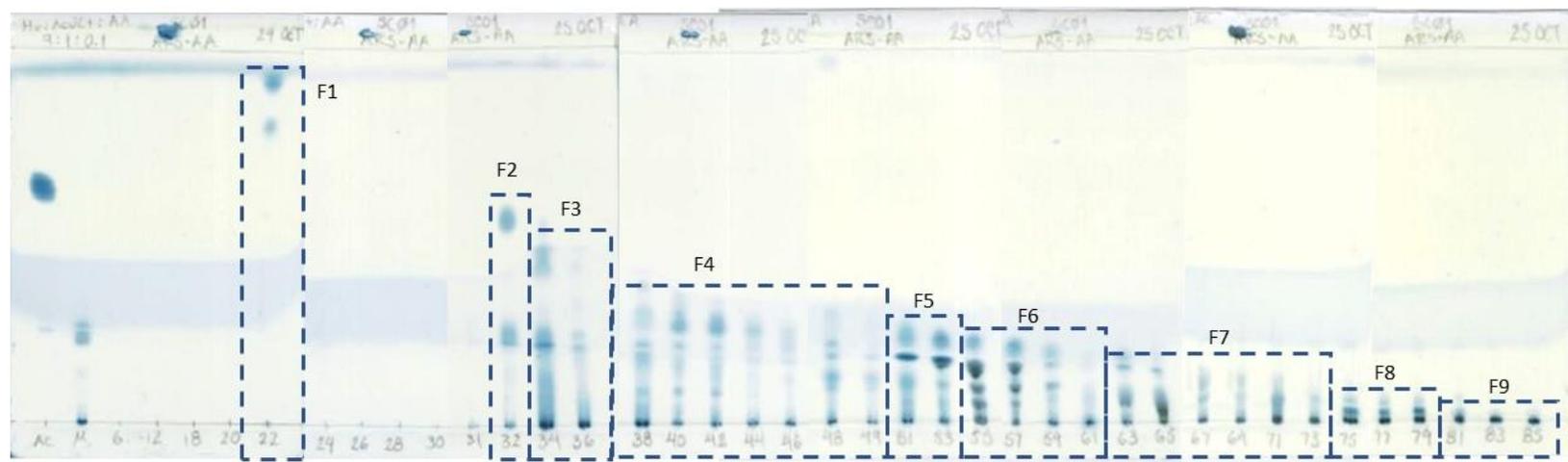


Figura 3.16. Cromatografía de capa fina de las fracciones del extracto de la biomasa proveniente del fotobiorreactor de 20 L

En la Figura 3.17 se muestra la marca de los triglicéridos de la F2 y en el canal TF2 el desvanecimiento de la mancha de los triglicéridos y generación de una marca en el Fr de 0.77, un Fr mayor dentro del rango de los ésteres metílicos de ácidos grasos. Esto indica que la reacción de transesterificación se llevó a cabo.

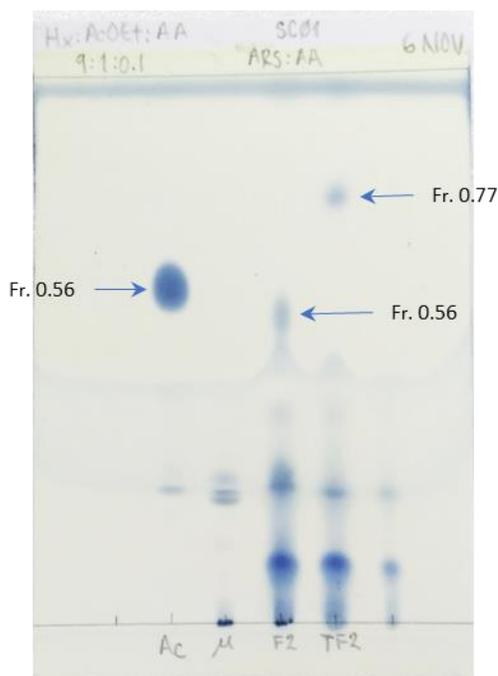


Figura 3.17. Cromatografía de capa delgada de la reacción de transesterificación Ac) Referencia de triglicérido. μ) Extracto lipídico; F2) fracción 2; TF2) muestra transesterificada de la fracción 2

3.9.1. Perfil de compuestos en extracto lipídico proveniente de FBR de 20 L.

Se analizaron las fracciones por CG/EM. Del total de los compuestos presentes en el extracto microalgal, solo se logró identificar por cromatografía de gases el 74.37% de los compuestos. La fracción 9 se evaluó por FTIR debido a la naturaleza hidrófila de las moléculas. Los cromatogramas de las fracciones del extracto microalgal se presentan en el Anexo B.

Tabla 3.2. Perfil de compuestos identificados en fracciones eluidas por cromatografía en columna

RT (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% DEL AREA TOTAL
10.135	C ₂ Cl ₆	Hexacloroetano	0.777
13.326	C ₁₀ H ₁₈ O	2-Decenal	0.207
15.69	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	Ester metílico del ácido 9-oxo-nonanoico	0.527
16.036	C ₁₅ H ₃₂	Trimetilo de 2,6,10-dodecano; Farnesano	0.254
16.183	C ₁₀ H ₂₀	1-Deceno	0.362
16.506	C ₂₀ H ₄₂	10-Metilnonadecano	0.216
16.807	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	Ester metílico del ácido dodecanoico	0.227
17.606	C ₁₆ H ₃₂	7-Hexadeceno	0.487
17.612	C ₂₀ H ₄₀	3-Eicoseno	1.999
17.697	C ₁₂ H ₂₆	3,8-Dimetildecano	0.218
17.697	C ₁₆ H ₃₄	Hexadecano	0.350
17.754	C ₁₇ H ₃₆	Heptadecano	0.187
18.57	C ₁₄ H ₂₈	4-Tetradeceno	0.317
19.103	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	Ester metílico del ácido tetradecanoico	0.130
19.63	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	6-Hydroxy-4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidrobenzofuran-2(4H)-ona	0.135
19.828	C ₁₈ H ₃₆	5-Octadeceno	0.478
19.834	C ₁₉ H ₃₈	1-Nonadeceno	1.109
19.834	C ₁₈ H ₃₆	9-Octadeceno	0.865
20.316	C ₂₀ H ₃₈	Neofitadieno	16.880
20.384	C ₂₀ H ₄₀	3,7,11,15-tetrametilo-2-hexadeceno	0.092
20.384	C ₁₈ H ₃₆ O	6,10,14-trimetilo 2-pentadecanona, Fitona	0.528
20.588	C ₂₀ H ₄₀ O	3,7,11,15-tetrametilo-2-hexadecen-1-ol, Fitol	7.880
20.968	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	Ester metílico del ácido 7-hexadecenoico	1.078
21.217	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	Ester metílico del ácido 9-hexadecenoico	1.489
21.251	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Ester metílico del ácido hexadecanoico	0.316
21.274	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Ester metílico del ácido 14-metil pentadecanoico	1.896
21.574	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	Metilo 4,7,10,13-hexadecatetraenoato	1.879
21.671	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido Hexadecanoico, Acido Palmítico	19.482
21.778	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Etilo de 9-hexadecenoato	0.214
22.135	C ₂₀ H ₄₀	9-Eicoseno	2.690
23.587	C ₁₈ H ₃₆	3-Octadeceno	0.306
23.847	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	Ester metílico del ácido 9,12-octadecadienoico	2.717
23.938	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	Ester metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	10.244
24.681	C ₁₈ H ₃₂ O	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	0.166

24.839	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Acido 9,12,15-octadecatricoico, ácido alfa-linolénico	1.750
24.981	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	Metilo 8,11,14,17-eicosatetraenoato	1.347
25.208	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido octadecanoico, Acido Esteárico	1.113
25.242	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	Ester etílico del ácido Linoleico	0.548
25.44	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	Ester etílico del ácido 9,12,15-octadecatricoico	2.723
28.207	C ₂₄ H ₄₈	1-Tetracoseno	1.025
28.212	C ₂₄ H ₄₈	Ciclotetracosano	1.364
29.482	C ₂₂ H ₄₄	1-Docoseno	0.444
29.482	C ₂₆ H ₅₂	1-Hexacoseno	0.200
29.488	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	Formiato de 1-heneicosilo	0.630
30.48	C ₃₅ H ₇₀	17-Pentatriaconteno	0.535
30.497	C ₂₄ H ₅₀	Tetracosano	0.623
31.03	C ₃₀ H ₆₀	13-Metil-Z-14-nonacoseno	1.287
32.413	C ₂₄ H ₅₀ O	1-Tetracosanol	3.273
34.266	C ₂₈ H ₄₈ O	(3β) Ergost-7-en-3-ol	1.014
34.646	C ₂₉ H ₄₈ O	(3β,5α) Stigmasta-7,16-dien-3-ol	1.653
34.68	C ₂₉ H ₄₈ O	Chondrillasterol	3.448
35.304	C ₂₉ H ₅₀ O	(3β,5α) Stigmasta-7-en-3-ol	0.321

En el extracto de *S. obliquus*, se identificaron 52 compuestos en total; estos se clasificaron dentro de 6 grupos de lípidos, hidrocarburos, triglicéridos, ácidos y alcoholes grasos, esteroides y terpenos; en orden de polaridad. En la Tabla 3.3 se presentan los porcentajes que ocupa cada grupo dentro del extracto lipídico total. En cultivo de ARS/acetato de amonio el mayor porcentaje es para ácidos y alcoholes grasos con un 20%, y el grupo con menor presencia son los esteroides con 4% (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Porcentajes de los grupos de lípidos en el extracto microalgal

GRUPO DE LÍPIDOS	# DE COMPUESTOS	% DEL AREA TOTAL
Hidrocarburos	22	11.85
Triglicéridos	13	18.68
Ácidos y alcoholes grasos	9	20.06
Esteroides	4	4.79
Terpenos	4	19.00

3.9.1.1. Hidrocarburos

Dentro del perfil de compuestos es relevante la presencia de una alta cantidad de hidrocarburos en el extracto de *S. obliquus*; representados por 22 compuestos alifáticos en su mayoría moléculas lineales entre el rango de C12-C20 con una insaturación y que comprenden el 11.9% del extracto microalgal total (Tabla 3.3). Los principales representantes son 9-Eicoseno y 3-Eicoseno con 2.0 y 1.5% en área total respectivamente (ambos con una cadena de C20), y ciclotetracosano (C24 el único alcano cíclico de esta fracción) con un 1% del extracto microalgal total. En microalgas marinas se presentan un mayor porcentaje de hidrocarburos de cadena impar entre C15 y C17 en su mayoría moléculas saturadas [96]. En trabajos similares desarrollados dentro del grupo de trabajo, Pedrero-Álvarez obtuvo 3.6% de hidrocarburos en cultivos de *Scenedesmus* sp. y Serrano-Vázquez, en cultivos de *Coelastrum* sp. obtuvo 3%. Ambos cultivos realizados en medio ARS/melaza y utilizando el método de maceración de la biomasa microalgal para la extracción de los lípidos [26,[89].

El porcentaje mayor de hidrocarburos en el extracto lipídico puede estar relacionado al efecto de cizalla cavitacional producida por el ultrasonido en el proceso de extracción. Este efecto nos permite disociar de mejor manera las uniones de las matrices biológicas en las que se encuentren ligadas las moléculas de lípidos, separándolos de otras moléculas; ya sea que estén unidos a proteínas o carbohidratos. De esta manera se obtiene una mayor cantidad de moléculas pertenecientes a hidrocarburos de cadena C10 hasta C30 [14,[98].

3.9.1.2. Triglicéridos

Para el caso de los triglicéridos, se identificaron 13 compuestos (bajo la forma de ésteres metílicos) con cadenas de entre C13 y C21 que comprenden el 18.7% del extracto total. Siendo los principales el éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (C18:3) con 7.6%, éster metílico del ácido 9,12-octadecadienoico (C18:2) con 2.0% y el éster etílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (C18:3, Figura 3.18).

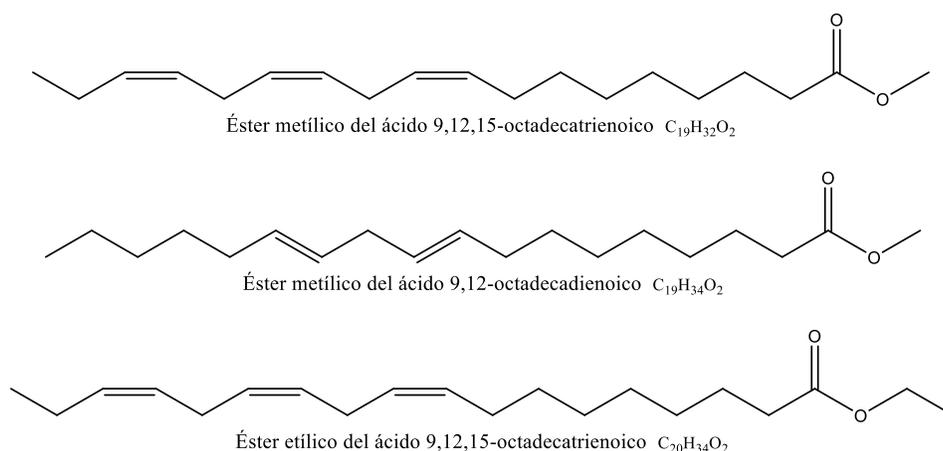


Figura 3.18. Principales ésteres metílicos del extracto lipídico de *S. obliquus*

Serrano-Vázquez [88] reportó una mayor cantidad de triglicéridos (42 %) en el extracto lipídico de *Coelastrum* sp. y Pedrero-Alvarez [26] reportó un 34.7 % de triglicéridos en los extractos lipídicos de *Scenedesmus* sp. cultivada en matraces tipo Celstir de 1 L. Estas diferencias se deben a que la producción de lípidos se ve afectada por el tipo de microalga y las condiciones de cultivo.

3.9.1.3. Ácidos y alcoholes grasos

Para los ácidos y alcoholes grasos; representados por 9 compuestos totales, el compuesto predominante en el extracto microalgal es el ácido palmítico (C16:0 ácido graso saturado), con un porcentaje por si solo de 14.4% del total del extracto; seguido del alcohol graso 1-tetracosanol (C24:1) con 2.4% y del ácido alfa-linoléico (C18:3) principal representante de la familia de compuestos omega 3 con 1.3% del extracto total (Figura 3.19).

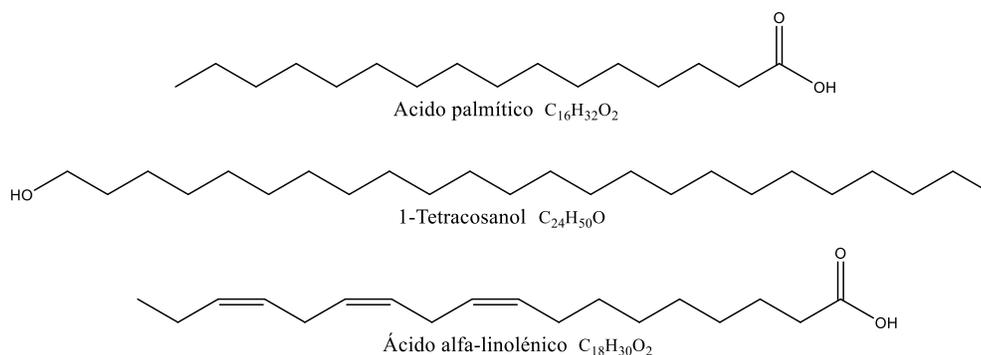


Figura 3.19. Principales ácidos y alcoholes grasos del extracto lipídico de *S. obliquus*

Según Mandal y Mallick en 2011 reportaron que cultivos realizados en aguas residuales presentan un elevado contenido de ácido palmítico, que es deseable para obtener un biodiésel de buena calidad [22].

3.9.1.4. Esteroles

Los esteroides son componentes esenciales de las membranas en microalgas eucariotas. Se reconoce una amplia diversidad de esteroides en microalgas, presentando variadas funciones biológicas, como la de proveer estabilidad a la membrana celular. Para especies de *Scenedesmus* sp. se ha reportado la presencia de fitoesteroides entre C28 - C30; uno de los encontrados en mayor cantidad es el ergosterol de 12-18%, seguido del condilasterol con 5% [24].

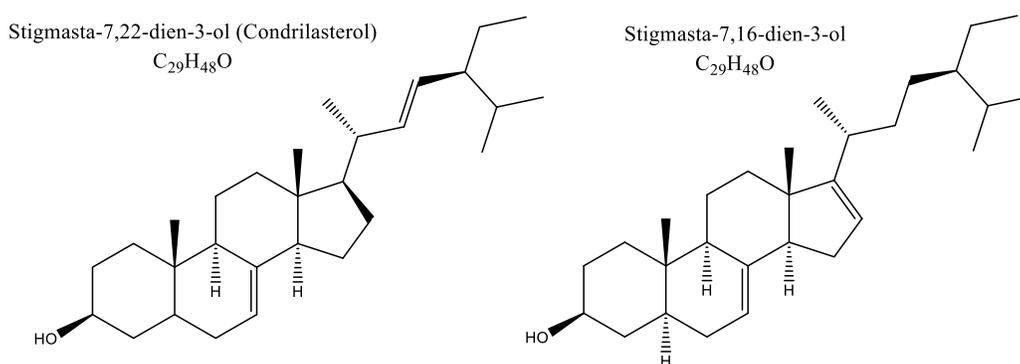


Figura 3.20. Principales esteroides del extracto lipídico de *S. obliquus*

Los esteroides (hidrocarburos policíclicos) son el grupo menos representativo dentro de los compuestos del extracto de *S. obliquus* con 4.8% del total del extracto lipídico. Dentro de los compuestos presentes en los esteroides, se presentan 4 compuestos. Con un 1% del área total del extracto, ergost-7-en-3-ol, (3.β.), un compuesto muy similar al ergosterol, que varía por la presencia de un doble enlace; el condilasterol (C29:2) con el 2.5% y el (3β, 5α) stigmasta-7,16-dien-3-ol (C29:2) con el 1.2% del extracto total de lípidos; ambos tienen la misma estructura molecular solo cambia la posición del doble enlace presente en el C16 en stigmasta-7,16-dien-3-ol y en el C22 en condilasterol (Figura 3.20).

La presencia de compuestos esteroides, son indicadores de organismos eucariotes microalgales. Este tipo de compuestos es utilizado como biomarcador de organismos eucariotes; y previamente se han utilizado como indicadores de fósiles moleculares de las membranas de lípidos para identificar la presencia de microalgas [99].

3.9.1.5. Terpenos

Este grupo de lípidos son sintetizados por organismos fotosintéticos, participan en funciones primarias como parte de pigmentos fotosintéticos o fijación de algunas proteínas a las membranas celulares. Los terpenos o isoprenoides están formados por la unión de varias unidades de isopreno, comúnmente conforman moléculas con cadenas largas de carbono espaciados regularmente con grupos metilo. En los terpenos, segundo grupo de compuestos más predominante con 19% del área total y representados por 4 compuestos, tenemos los predominantes como el neofitadieno, hidrocarburo ramificado (C₂₀:2) ocupando el 12.5% del extracto y el fitol (C₂₀:1) con 5.8% en área de los lípidos totales alcohol diterpénico acíclico (Figura 3.21). En menor proporción tenemos el fitona y el farnesano.

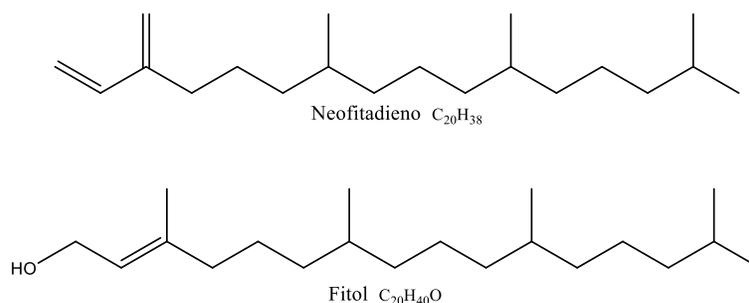


Figura 3.21. Principales terpenos en extracto lipídico de *S. obliquus*

El fitol es un diterpeno de 20 carbonos con un enlace doble, la presencia de este compuesto en el extracto se atribuye principalmente a que forma parte de la estructura básica de la clorofila presente en microalgas, lo que favorece la solubilidad de la clorofila en la membrana lipídica con la función de una cola hidrofóbica. Es probablemente el terpenoide acíclico más abundante en la biosfera del planeta [24,[100],[101]. En comparación con otros extractos microalgales de especies de la familia Scenedesmaceae como *Coelastrum* sp., se registra que los cultivos crecidos en ARS complementadas con melaza, no se presenta una concentración más alta de 0.1% de fitol en extractos lipídicos; esto muy probablemente debido a una decoloración en los cultivos de *Coelastrum* sp. durante los experimentos que se reportan con esta cepa, y a su vez en cultivos en medio TAP cosechados al día 15 con aproximadamente 27×10^6 cel mL⁻¹, presentan una concentración de 5.1% en fitol [89]. En cultivos con ARS/acetato de amonio a 25×10^6 cel mL⁻¹, se presenta el 5.8% de fitol en el extracto completo; una concentración similar a la

registrada en cultivos TAP. Se ha registrado que cultivos microalgales al aumentar la concentración celular se genera ensombrecimiento y una limitación de la cantidad de luz que llega a cada una de las células en el fotobiorreactor; esto se compensa con la producción de una mayor cantidad de clorofila por parte de las células [9][33].

Los terpenos microalgales constituyen una buena fuente alternativa de materia prima para la elaboración de biocombustibles como bioturbosina; su hidrotreamiento representa una ruta renovable en exploración para la obtención de estos biocombustibles [102],[103].

3.9.1.6. Fosfolípidos

Los fosfolípidos son moléculas polares y no se contó con una columna adecuada para el análisis por CG-EM. Por lo que se optó por analizarla mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Esta técnica es sensible a la estructura molecular, ya que refleja las vibraciones características de los grupos de átomos de los grupos funcionales no importando la polaridad de la molécula (Figura 3.22).

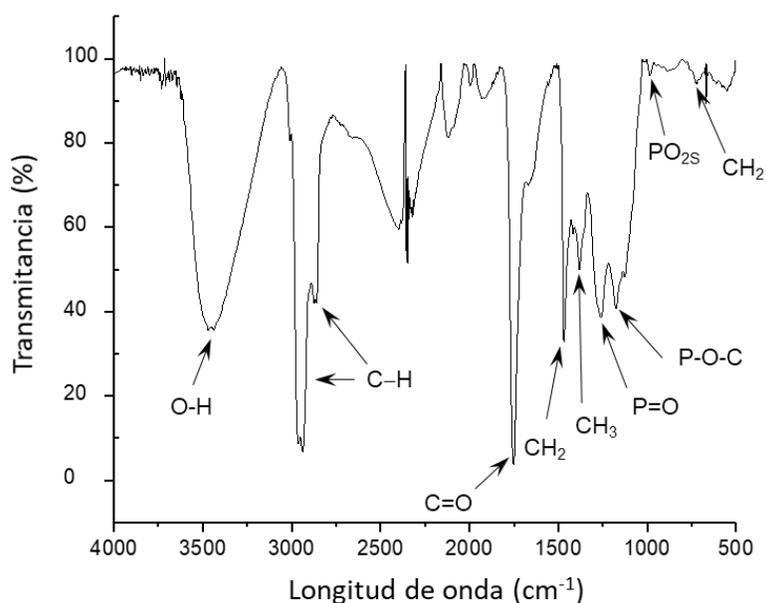


Figura 3.22. Espectro FTIR de la fracción 9

En la Figura 3.22 se presenta con valores porcentuales de transmitancia la detección de distintas señales presentes en los compuestos de la fracción 9 del extracto eluido. Se identifica en longitudes de onda la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, fosfato, metilo, metileno y enlaces C-H, diésteres fosfato (PO_2). La combinación de las distintas señales

puede representar la presencia de distintos grupos moleculares presentes en la muestra analizada.

La señal en la longitud de onda 3450 cm^{-1} corresponde a vibraciones de estiramiento del enlace O-H. La señal a 2929 y 2875 cm^{-1} pertenecen al estiramiento asimétrico de los enlaces C-H.

La señal presente en la longitud de onda de 1749 cm^{-1} corresponde a un fuerte enlace C=O, debido a los grupos éster presentes en las moléculas de fosfolípidos, en conjunto con las señales en las longitudes 2929 y 2875 cm^{-1} de enlaces C-H, de 1167 cm^{-1} representante del enlace P-O-C y de 980 del grupo PO_2 ; son indicadores de la presencia de moléculas de fosfolípidos [104].

El conjunto de las señales en las longitudes de onda en 3450 cm^{-1} del enlace O-H y la de 2929 y 28752 cm^{-1} del enlace C-H, señalan la presencia de alcoholes grasos. Las señales de los enlaces C-H en longitudes de onda de 2800 , 1380 y $1465\text{ (cm}^{-1})$, describen a moléculas de alcanos, y que en conjunto con C=O en la longitud de onda de 1749 cm^{-1} , evidenciarían la presencia de triglicéridos.

En comparación con Pedrero-Álvarez [26] quien realizó trabajos previos utilizando la misma cepa de *S. obliquus*, la intensidad de las señales por parte de los enlaces P-O-C (1167 cm^{-1}) y PO_2 (980 cm^{-1}) principalmente son significativamente menores; esto puede deberse a la modificación en la metodología de extracción, en donde contando con el extracto de lípidos totales, se realizó un lavado con agua al extracto disuelto en cloroformo (sin metanol), para la separación de los lípidos polares (fosfolípidos, esfingolípidos y gliceroglicolípidos) de los lípidos neutros (ácidos grasos, ceras, esteroides) presentes en la muestra.

CAPITULO 4

CARACTERIZACIÓN DEL CATALIZADOR Y REACCION DE HIDRODESOXIGENACIÓN

En el presente capítulo se presentan los resultados y discusión de la caracterización del catalizador sintetizado a partir de la zeolita comercial ZSM-22, así como de la reacción de hidrodesoxigenación realizada de los lípidos producidos por *Scenedesmus obliquus*.

4.1. Caracterización del catalizador

4.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido de Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃

El catalizador presentó estructuras de 2 a 15 μ m de diámetro, conformadas principalmente de gama alúmina (γ -Al₂O₃) (Figura 4.1A). Estas partículas fueron cubiertas por arreglos en forma de cristales de distintos tamaños de la zeolita ZSM-22 (Figura 4.1B). La presencia de los cristales de la zeolita en la superficie de la gama alúmina, indicó que hubo impregnación entre ambas.

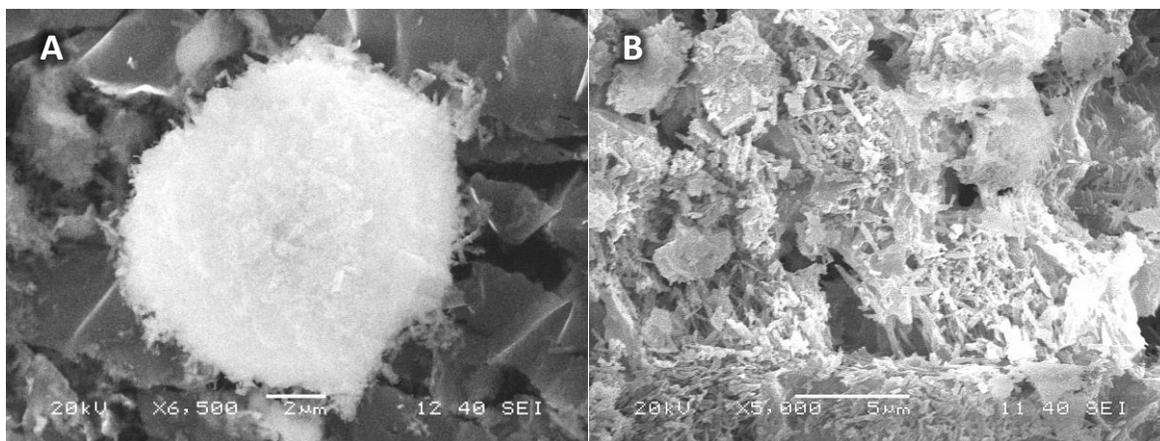


Figura 4.1. Microfotografía de Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃. A) Agregados de γ -Al₂O₃. B) Partículas de γ -Al₂O₃ cubiertas por cristales de ZSM-22)

La γ -Al₂O₃ es el soporte más utilizado en reacciones heterogéneas, presenta propiedades benéficas como una alta estabilidad y una acidez de moderada a ligera; sin embargo, puede presentar desactivación catalítica debido a la formación de coque [105].

4.1.2. Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS)

Mediante EDS se analizó la composición química elemental de la superficie del catalizador para la determinación de la dispersión y cantidad de metal Pt fijado en el catalizador. El análisis por EDS dio un valor promedio de 1.084% de Pt en peso total, presente en el catalizador; lo que corresponde con la cantidad esperada de Pt impregnado; al haber utilizado la metodología de humedad incipiente para conseguir 1% de platino en catalizador. En la Figura 4.2 se muestra el mapeo de la superficie del catalizador a 300 μm . Se observan indican con puntos rojos donde se detectó el Pt; presentando una buena dispersión a lo largo de la superficie del catalizador, evitando la aglomeración del metal; lo que nos indica una correcta impregnación de Pt.

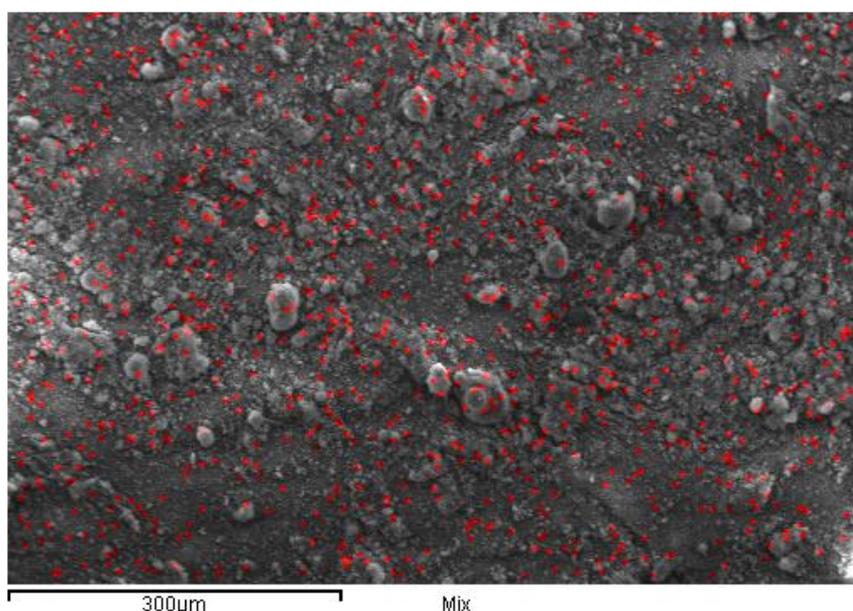


Figura 4.2. Mapeo de Platino en la superficie del catalizador Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃

Se ha registrado que en catalizadores acoplados con metal, la dispersión de la carga metálica influye en las reacciones de hidrodeshidrogenación, ya que a una mayor carga metálica se genera la aglomeración en cúmulos metálicos en la superficie del catalizador y decae la tasa de conversión por hidrodeshidrogenación del catalizador [69].

4.1.3. Difracción de Rayos X (DRX)

La difracción por rayos X, es una de las técnicas más utilizadas para conocer la composición mineral presente en una muestra pulverizada. La interacción de los rayos X

monocromáticos con los cristales de la muestra, crean las señales de difracción generando un difractograma único para cada material. Para asegurarse de que la zeolita comercial (ZSM-22) no contara con agente estructurante o remanente de materia orgánica se calcinó a 500 °C. Posterior al calcinado de la zeolita comercial ZSM-22; se realizó un análisis por DRX para obtener su patrón de difracción y se corroboró la estructura cristalina con la reportada por materiales ACS [106].

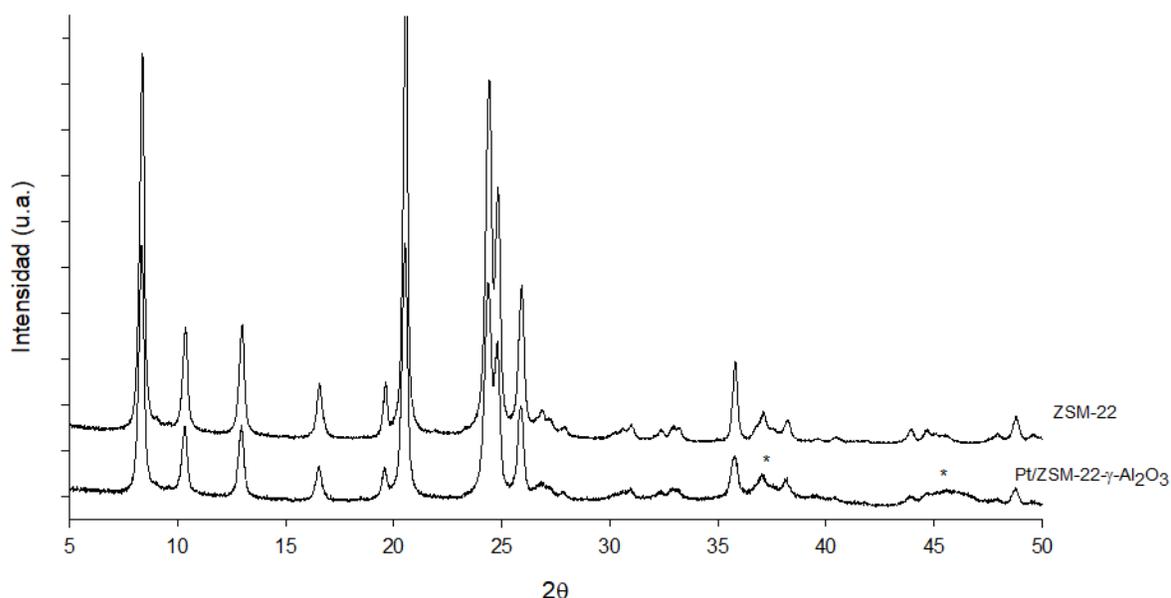


Figura 4.3. Difractogramas de rayos X de la zeolita ZSM-22 y el catalizador Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃

En la Figura 4.3 se presentan los patrones de difracción de la zeolita ZSM-22 comercial calcinada y el patrón del catalizador una vez sintetizado; se muestra que la estructura cristalina de la zeolita se conserva aún después de depositarse en la matriz de alúmina y adicional al patrón de difracción de la zeolita, se presentan picos anchos en 37°, 45.8° correspondientes a las fases de la estructura de γ -Al₂O₃ [69].

El patrón de difracción de la muestra del catalizador sintetizado se contrastó con patrones de referencia de la base de datos de cristalografía de compuestos inorgánicos (Crystallography Open Database, COD) de acceso libre; utilizando el software MATCH! v.3.7.0.124.

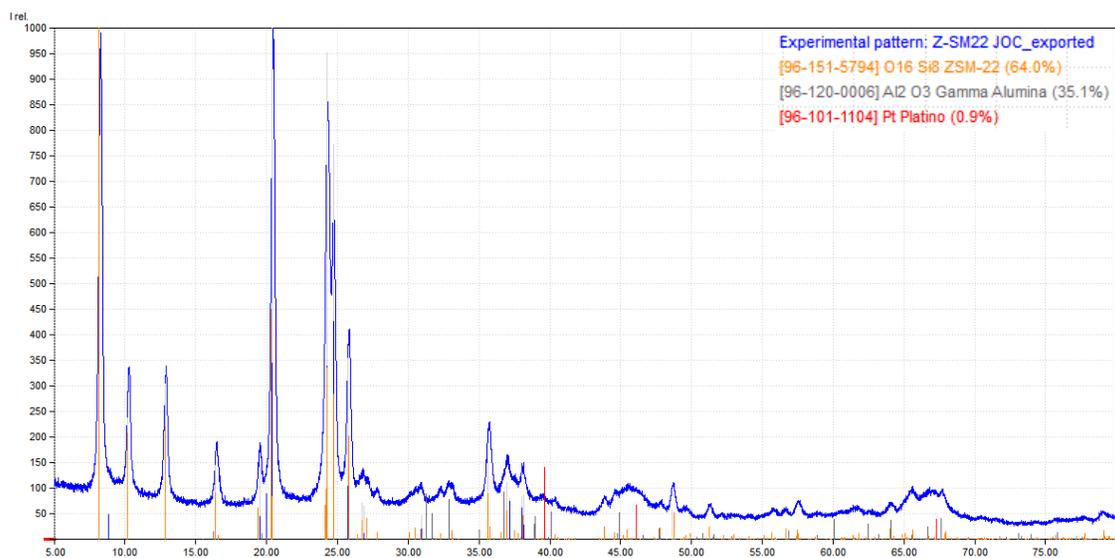


Figura 4.4. Difractograma de Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃

En la Figura 4.4, se presenta el difractograma del catalizador y las fases identificadas de los compuestos presentes con un estimado porcentual de zeolita (ZSM-22) de 64.0%, un 35.1% de gamma alúmina (γ -Al₂O₃) y un 0.9% de metal Platino (Pt). Los valores de ZSM-22 y γ -Al₂O₃ son próximos a los valores considerados en la síntesis del catalizador, de 60% ZSM-22 y 40% de γ -Al₂O₃; lo que nos indica que el proceso de síntesis del catalizador se dio de manera adecuada. El valor porcentual del platino es cercano al valor obtenido por EDS, confirmando la presencia del metal en un valor promedio de 1% en peso en el catalizador Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃

4.1.4. Fisisorción de Nitrógeno.

Es un análisis para la determinación de la capacidad de adsorción de muestras porosas; se realiza mediante la determinación de la relación de equilibrio entre la cantidad de gas adsorbido por el sólido poroso (catalizador) y la presión del gas a temperatura constante. La relación entre las moléculas adsorbidas y la presión a temperatura constante se puede representar por isotermas que constan de un proceso de adsorción y uno de desorción; y cuando el camino de desorción no coincide con el de adsorción, se produce un ciclo de histéresis. Las isotermas nos ayudan a calcular el área superficial, diámetro de poro y volumen de poro para nuestro catalizador [107].

En la

Figura 4.5 se observa la isoterma de adsorción-desorción del catalizador Pt/ZSM-22- γ - Al_2O_3 en donde se representa la presión del gas en equilibrio (presión relativa P/P_0) en el eje X, y en el eje Y la cantidad de gas adsorbido en $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$. El tipo de isoterma según S. Brunauer, P. Emmett y E. Teller (BET), pertenece a una isoterma tipo IV con histéresis tipo H2 que corresponde a una adsorción en multicapas característico de materiales mesoporosos con tamaño de diámetro de poro entre 2 a 50 nm; con secciones tanto estrechas como amplias y con posibles canales de interconexión [108].

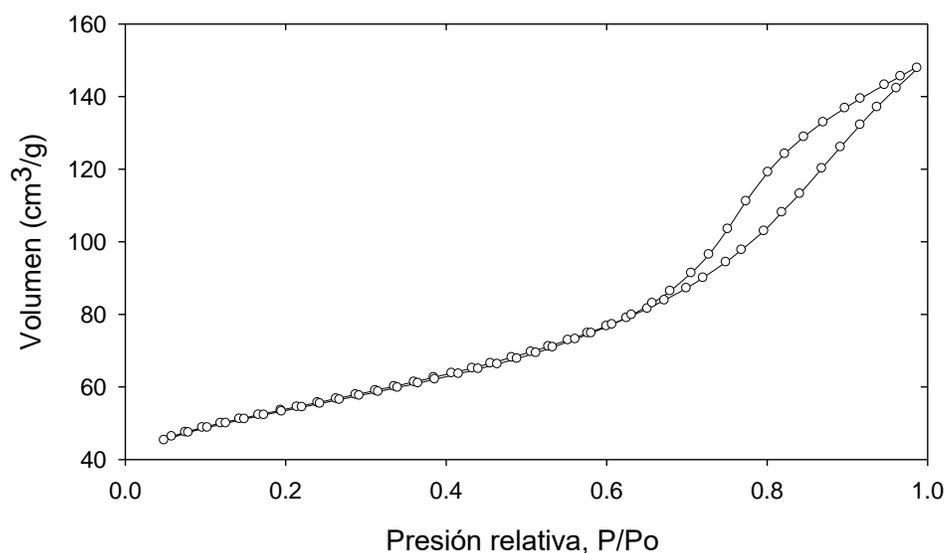


Figura 4.5. Isotherma de adsorción-desorción del catalizador Pt/ZSM-22- γ - Al_2O_3

Las propiedades texturales del catalizador se resumen en la Tabla 4.1. Estos valores son muy semejantes a lo reportado y obtenido por Contreras y cols. para ZSM-22- γ - Al_2O_3 con $227 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ de área; diámetro de poro de 65 \AA y por Martens y cols. de $203 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ de área, y $0.17 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ de volumen de poro [69],[109]

Tabla 4.1. Caracterización del catalizador Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃

VARIABLE		
Área superficial (BET)	194.71	m ² g ⁻¹
Diámetro de poro (BJH)	81.72	Å
Volumen de poro	0.178	cm ³ g ⁻¹
Contenido de Platino (SEM-EDS)	1.084	% en peso
Contenido de Platino (DRX)	0.9	%

La apertura del tamaño de poro de la zeolita ZSM-22 se encuentra entre 0.44 y 0.55nm (4.4 y 5.5 Å) [110]. El diámetro de poro obtenido en la síntesis de Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃ es de 81.72 Å, que es igual a 8.173nm lo que indica que al sintetizar el soporte y juntar la alúmina con el ZSM-22, se generan mesoporos en el rango de 2 a 50 nm. Catalizadores con un tamaño de poro más pequeño <2nm (microporosos) presentan dificultad en los fenómenos de transferencia de masa cuando los reactivos y/o productos son voluminosos, lo que ocasiona la obstrucción de poros por desactivación o por formación de coque [111]. Por lo anterior; el catalizador desarrollado (Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃), presenta propiedades mesoporosas adecuadas para el hidrotratamiento de la materia prima como los aceites microalgales, los cuales presentan una amplia gama de compuestos.

4.2. Reacción de hidrodeseoxigenación

Una vez sintetizado el catalizador, se evaluaron por catálisis 3 moléculas que sirvieron como estándar y guía para monitorear el proceso de HDO, siguiendo la metodología del apartado 2.17.

4.2.1. Estándares

Para la estimación de los porcentajes de los compuestos se basó en el área total de las señales de los compuestos, descartando la señal del octano. Los cromatogramas de las reacciones de HDO de los estándares se presentan en Anexos C.

4.2.1.1. Hidrodesoxigenación de heptadecano

En la reacción de hidrodesoxigenación del estándar heptadecano se generan tres principales productos de reacción, 2,6,10-trimetil tetradecano, propil-ciclopentano y 1-etil-2-metil, cis-ciclopentano (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Productos de reacción de la HDO del heptadecano

COMPUESTO	% AREA TOTAL
1-etil-2-metil cis-ciclopentano	2.7
Propil ciclopentano	5.4
2,6,10-trimetil tetradecano	9.7
Heptadecano	82.1

Aunque se presentan reacciones catalíticas en la hidrodesoxigenación, estas fueron mínimas. La transformación de la cadena saturada del hidrocarburo no fue completa quedando 82% de la molécula sin convertir, y solo un 18% del total del heptadecano se modificó. El 8.1% del estándar puede deberse a procesos de hidrocraqueo, isomerización y ciclización generando productos de reacción de cadenas cíclicas de 8 carbonos y el 9% se presenta como cadenas ramificadas probablemente debido a un proceso de isomerización.

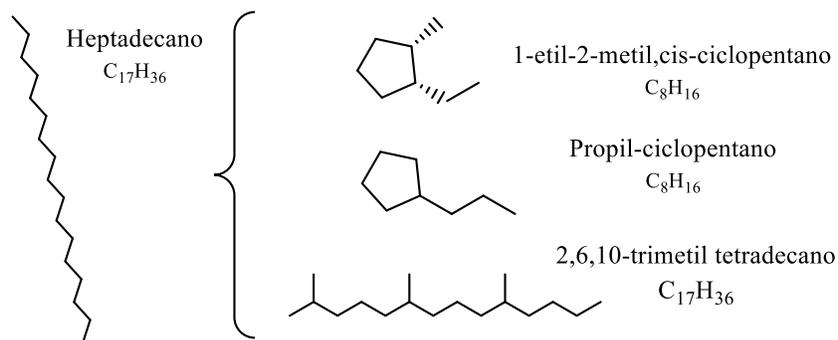


Figura 4.6. Principales productos de reacción de la HDO del heptadecano

La naturaleza ácida del catalizador promueve el craqueo e isomerización de las moléculas de alcanos (parafinas) en alcanos ramificados (isoparafinas). El craqueo se lleva a cabo en los sitios ácidos, mientras que la isomerización se crea en el primer lóbulo del poro (isomerización en la abertura de poros); cuanto más profundo penetra el alcano en el poro más fuerte es la interacción, no se requiere que toda la molécula entre a los poros para que

se dé el proceso de ramificación, esto explica la preferencia por la ramificación de los átomos de carbono cerca de los extremos de la molécula del alcano [112].

4.2.1.2. Hidrodesoxigenación de colesterol

En la reacción de HDO con colesterol:octano, se identifica un proceso de hidrogenación en el C3 de la molécula de colesterol y la saturación del enlace entre el C5 y C6; obteniendo colestano y coprostando ambos de fórmula $C_{27}H_{48}$, con una diferencia estructural en el H del C5 como se muestra en la Figura 4.7.

Tabla 4.3. Productos de reacción de la HDO del colesterol

COMPUESTO	% AREA TOTAL
1-etil-2-metil cis-ciclopentano	1.5
Propil ciclopentano	2.9
Hexadecano	6.6
Coprostando	34.7
Colestano	54.3

Es relevante mencionar que, en el análisis de cromatografía de gases, no se encontró la presencia de colesterol en los productos de reacción, lo que nos indica que en el proceso de hidrodesoxigenación se llevó a cabo la transformación completa del esterol a coprostando y colestano.

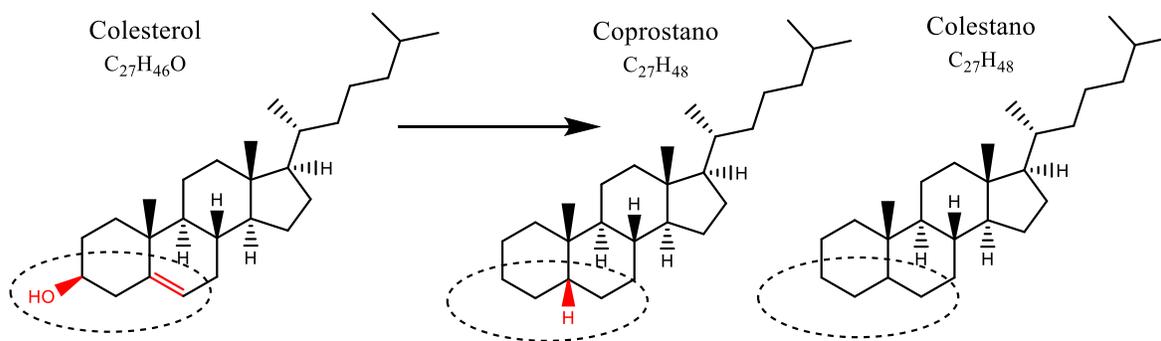


Figura 4.7. Principales productos de reacción de la HDO del colesterol

La hidrogenación del colesterol con Pt soportado sobre ZSM-22- γ - Al_2O_3 , parece deberse a una selectividad por el grupo hidroxilo (OH) del C3 por parte de los sitios metálicos del catalizador en donde el H es más reactivo. Previamente a la hidrogenación, tanto el enlace C=C y C-O deben ser activados. Dicha activación se produce por formación de enlaces

lineales o puentes con los centros metálicos activos, ya sea Pt-C o Pt-O. En cualquier caso, el proceso implica una ruptura parcial de los enlaces, seguido de la formación de un nuevo enlace con el centro activo [107]. Posteriormente se da lugar la hidrogenación, generando la saturación de la doble ligadura y el desplazamiento del grupo hidroxilo (-OH), dándonos dos isómeros, una molécula con el hidrógeno del C5 orientado para “arriba” y otra molécula con el enlace de H orientado para abajo. Estas reacciones de hidrogenación y saturación se llevan a cabo en la fase metálica del catalizador [69].

4.2.1.3. Hidrodesoxigenación de triestearina

En la reacción de hidrodesoxigenación de la mezcla triestearina:octano; se obtienen 6 compuestos, 2 parafinas, pentadecano y hexadecano con 8.5 y 10% respectivamente; 2 isoparafinas 7 y 8-metil heptadecano con 25 y 24.7%; y 2 ésteres metílicos, del ácido 14-metil pentadecanoico y del ácido esteárico; probablemente derivados de los procesos de craqueo e isomerización de la estearina.

Tabla 4.4. Productos de reacción de la HDO de la triestearina

COMPUESTO	% AREA TOTAL
Pentadecano	8.5
Hexadecano	10.0
7-metil hexadecano	25.0
8-metil heptadecano	24.7
Ester metílico de ácido 14-metil pentadecanoico	10.9
Ester metílico de ácido esteárico	20.9

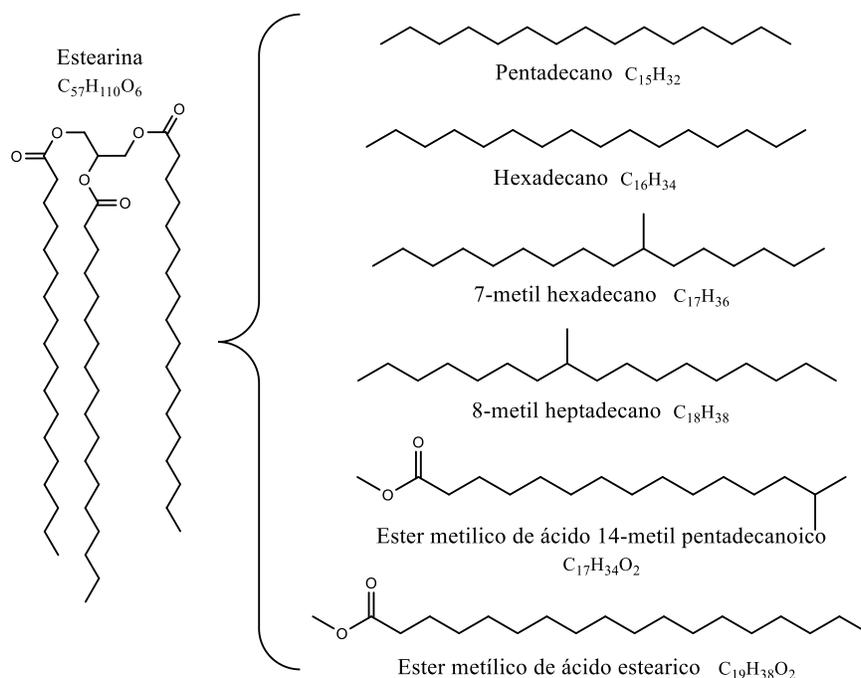


Figura 4.8. Principales productos de reacción de la HDO de la tristearina

Como resultado de la transformación de la tristearina por el hidrotreatmento con Pt/ZSM-22- γ - Al_2O_3 , se obtuvieron 3 tipos de compuestos (parafinas, isoparafinas y ésteres metílicos) que se encuentran en el rango de combustibles renovables. En la Tabla 4.5 se presentan los porcentajes de las fracciones de biocombustibles que se lograron obtener, el biocombustible que más se produjo es diésel verde representando casi el 50% de los productos de reacción.

Tabla 4.5. Biocombustibles obtenidos de la HDO de la tristearina

BIOCOMBUSTIBLE	% DEL TOTAL DE COMPUESTOS IDENTIFICADOS
Bioturbosina	18.6
Diésel Verde	49.7
Biodiésel	31.8

4.2.2. Productos de la reacción de hidrodesoxigenación.

En el análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas del producto de reacción del extracto microalgal; se logró identificar 17 compuestos, lo que representó el 88.72% del área total de los productos de reacción (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Productos de la reacción de hidrodesoxigenación

#	RT (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% AREA TOTAL
1	4.036	C ₈ H ₁₆	1-etil-2-metilciclopentano	4.721
2	4.138	C ₈ H ₁₆	1,2-dimetilciclopentano	1.420
3	4.211	C ₈ H ₁₆	Propilciclopentano	9.363
4	14.931	C ₁₅ H ₃₂	2,6,10-trimetildodecano; Farnesano	8.381
5	15.696	C ₁₅ H ₃₀	1-(1,5-dimetilhexil)-4-metilciclohexano	6.704
6	15.849	C ₁₀ H ₂₀	1-metil-4-(1-metilhexil)-trans-ciclohexano	5.558
7	15.877	C ₁₅ H ₂₄	1-(1,5-dimetilhexil)-4-metilbenceno	3.396
8	18.825	C ₂₀ H ₄₂	10-metilnonadecano	1.005
9	20.015	C ₂₀ H ₄₂	2,6,10,14 tetrametilhexadecano	9.544
10	20.265	C ₂₀ H ₄₀	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno	4.491
11	21.268	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Éster metílico del ácido 14-metil pentadecanoico	12.471
12	21.688	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido hexadecanoico / Ácido Palmítico	1.950
13	24.488	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	Ester metílico de ácido esteárico	16.857
14	28.938	C ₂₆ H ₅₄	Hexacosano	1.160
15	30.882	C ₂₇ H ₄₈	Colestano	0.178
16	31.483	C ₂₈ H ₄₈	5- α -ergost-8(14)eno	0.449
17	32.095	C ₂₈ H ₄₆ O	Ergosta-5,22-dien-3-ol	1.069

Del extracto lipídico que sirvió de materia prima, se identificaron 52 compuestos y después de la reacción, se obtuvo una mezcla menos compleja, de 17 compuestos.

Para poder valorar el comportamiento del sistema utilizado en este trabajo, se analizó primeramente la presencia de compuestos con número de carbonos dentro del rango de la bioturbosina. Esto se realizó tomando como base el área total de los picos correspondientes a los compuestos identificados tanto en la materia prima (extracto microalgal), como en los productos de reacción (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Variación del número de carbonos durante el proceso de HDO

# de Carbonos	% DEL AREA TOTAL ^a	
	Alimentación	Productos
C5-C7	1	0
C8-C16 ^b	23	47
C17-C35	76	53

^a de los picos identificados; ^b rango de la bioturbosina

Como reportaron Dermibas y Dermibas en 2010, los rangos de la longitud de cadena de carbonos de los biocombustibles se sobreponen; por lo que se delimitan en este trabajo los tamaños de cadena; clasificándose para la nafta o biogasolina un largo de cadena de entre C5 y C7, para la bioturbosina moléculas de cadena entre C8 a C16, para el diésel verde de C17 a C22, y para biodiésel de C17 a C22 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), apoyándose en lo reportado por Gutiérrez-Antonio y cols., Liu y Chen [9,[113],[114].

Se puede observar que, de manera global, hay una disminución en el número de carbonos (tamaño de los compuestos) después que la materia prima es tratada por el proceso de HDO. En la fracción C17-C35 se encuentran dos ésteres metílicos que son considerados como biodiésel y representan el 62% de esta fracción. Este resultado indica que las condiciones de reacción favorecen la formación de biocombustibles del tipo bioturbosina y biodiésel. El control de las condiciones de reacción es importante para evitar un craqueo excesivo, como se explica a continuación.

Las isoparafinas con múltiples ramificaciones como el farnesano presentan carbonos terciarios formados por los grupos metilo a lo largo del esqueleto de carbono, hacen que las moléculas sean especialmente susceptibles al craqueo catalítico en la unión del carbono beta (en rojo, Figura 4.10) y conducen a productos de reacción ramificados (hemiterpenos, 5C) con altos índices de octano, que mejoran las propiedades de gasolina. De igual manera los productos de cadenas de 10 carbonos o monoterpenos, mejorarán las propiedades de la bioturbosina que se pueda obtener por HDO [102].

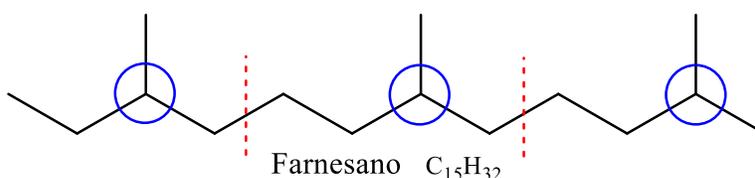


Figura 4.9. Molécula de Farnesano, en azul señalados los carbonos terciarios

El farnesano representa el 7.1% de los productos de reacción, conforma un compuesto isoprenoide saturado que ha sido aprobado por la ASTM como bioturbosina renovable en 2014 y posteriormente por la Agencia Nacional del Petróleo (ANP) para poder ser utilizada en mezcla al 10% con turbosina.

La ASTM aprueba la mezcla de farnesano producido con azúcar de caña, con combustible aeronáutico en una mezcla al 10%. El costo y energía requerida para su producción aun no son viables, pero defensores afirman que esta medida provee una mayor distancia de vuelo en base a la biomasa producida por hectárea, que para la mayoría de las otras rutas de producción de bio-turbosina [115].

Otra característica que se analizó fue el grado de isomerización de los compuestos presentes tanto en la alimentación como en los productos de reacción. Para ello, se consideró igualmente, la contribución del área del pico de cada compuesto al total del área de los compuestos identificados. Los compuestos fueron clasificados en lineales, ramificados y cíclicos (Tabla 4.8). La relación entre isoparafinas y parafinas es una medida del nivel de ramificación del biocombustible; un mayor nivel de ramificación confiere una mejor calidad al biocombustible por aumentar el número de octano y mejorar su punto de congelación; esto nos indica que un 100% de isoparafinas en los productos de reacción, esto entrega una bioturbosina de buena calidad.

Tabla 4.8. Variación de la estructura molecular durante el proceso de HDO

ESTRUCTURA	% DEL AREA TOTAL	
	Alimentación	Productos
Lineal	64.9	22.5
Ramificada	27.3	44.3
Cíclica ^a	7.8	33.2

^a Los compuestos esteroideos fueron considerados en esta categoría

Se puede observar que después de la HDO hay un aumento en el contenido de compuestos ramificados y cíclicos lo que indica que el catalizador y las condiciones utilizadas favorecieron la producción de un biocombustible con características similares a la bioturbosina.

En la Tabla 4.9, se presenta la variación en la cantidad de oxígeno presente en las moléculas lipídicas antes y después del tratamiento de HDO.

Tabla 4.9. Variación de la presencia de compuestos oxigenados en el proceso de HDO

COMPUESTOS	% DEL AREA TOTAL	
	Alimentación	Productos
Con oxígeno	58.5	36.5
Sin oxígeno	41.5	63.5

Se puede observar que en los productos de reacción hay una disminución en la cantidad de oxígeno molecular, esto indica que se presentaron procesos de hidrogenación utilizando el catalizador Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃ a las condiciones de reacción utilizadas. De igual manera, se observa que no hay un desplazamiento total del oxígeno molecular. En los productos de reacción se observó la presencia de dos ésteres metílicos (biodiesel), compuestos oxigenados que representan el 33.1% del área total de los productos de reacción identificados. Siendo el objetivo de este trabajo la producción de bioturbosina, es necesario estudiar las condiciones de reacción en el proceso de HDO para lograr la desoxigenación de los ésteres metílicos. También hay que tomar en cuenta que la mezcla de reacción podría ser separada por métodos convencionales y obtener como productos biodiesel y bioturbosina. La ausencia de compuestos oxigenados en el rango de la bioturbosina aumenta el poder calórico, nos reduce la formación de contaminantes en la combustión (evitando la formación de coque) y ayuda a mantener las características del bio combustible a mayor tiempo de almacenamiento [116].

En el caso de la bioturbosina, al ser una mezcla de isoparafinas, los compuestos con insaturaciones no son deseables. No obstante, tanto el extracto microalgal como los productos de reacción presentaron compuestos con insaturaciones. Es por ello, que en la Tabla 4.10 se presenta la variación de los compuestos insaturados después del proceso de HDO.

Tabla 4.10. Variación de los compuestos insaturados después de la HDO

COMPUESTOS	NO. DE COMPUESTOS	
	Alimentación	Productos
Saturados	9	11
Insaturados	43	6

Se puede observar que la presencia de un mayor número de compuestos insaturados en la materia prima se revierte después de la reacción de hidrodeshidrogenación.

Se ha reportado que la presencia de insaturaciones en aceites vegetales puede afectar la actividad y la selectividad de los catalizadores. De igual manera, un alto consumo de hidrógeno al inicio del proceso de HDO está asociado con altos grados de insaturación [42]. Como un ejemplo, en este trabajo, se pudo observar la presencia del éster metílico del ácido octadecatrienoico en la alimentación y después del proceso de HDO este compuesto no se detectó, observándose, por otro lado, la presencia del éster metílico de ácido esteárico el cual es el compuesto saturado del primero.

Como ejemplo de la complejidad del proceso de HDO utilizando extractos microalgales se puede mencionar lo siguiente:

En el extracto lipídico, se detectó la presencia 13 ésteres metílicos que representaron el 25.2% del área total de los compuestos identificados. Posteriormente a la reacción de HDO, se detectaron solamente 2 ésteres metílicos, también presentes en la alimentación, que representaron el 33.1% del área total de compuestos identificados. Con la información disponible, no es posible determinar si durante el proceso de HDO hubo más formación de estos dos últimos compuestos.

En el caso del ácido hexadecanoico, mostró una disminución de 19.5% del área total de los compuestos identificados en la alimentación, a 2.2% en los productos de reacción, lo que indica que fue transformado a otros compuestos.

La temperatura juega un papel muy importante en las reacciones, ya que el cambio de ésta puede influir en la selectividad y en la adsorción del sustrato sobre la fase soportada, aumentando las tasas de desoxigenación, isomerización y crackeo. En el presente trabajo se utilizó la temperatura de 315 °C porque normalmente a una temperatura mayor de 330

°C empieza a generarse rompimiento térmico, por lo que se obtienen moléculas de cadena corta que no son el tipo de molécula blanco para generar bioturbosina [107],[117].

CONCLUSIONES

- Se logró establecer un cultivo de *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactor de 20L, utilizando agua residual sintética como medio de cultivo y acetato de amonio como fuente de C y N.
- El método de extracción modificado de Bligh & Dyer (1959) asistido con ultrasonido no representó una diferencia significativa en la extracción de los compuestos lipídicos en comparación con el asistido con maceración de la biomasa; aunque reduce la cantidad de solventes, material y tiempos de extracción empleados; lo que podría permitir en un futuro una obtención más rápida y eficiente de lípidos reduciendo costos y teniendo un menor impacto ambiental.
- Los cultivos con ARS enriquecida con acetato de amonio; se desarrollaron de manera adecuada sin presentar una disminución en el pH, logrando 23×10^6 cel mL⁻¹ y 6.31 ± 0.12 g de biomasa seca y de los cuales se logró 1.16 g de extracto promedio por fotobiorreactor. La producción de biomasa y de lípidos es menor que la reportada en la literatura para otros sistemas. Es necesario continuar con estudios de optimización de las condiciones de cultivo para mejorar los rendimientos.
- A partir de extractos lipídicos de *S. obliquus* se logró obtener una mezcla de compuestos que representa 46.7% de bioturbosina, 33.1% de biodiesel y 16.7% de diésel verde.
- El catalizador Pt/ZSM-22- γ -Al₂O₃ presentó propiedades adecuadas para su uso en la producción de bioturbosina a partir de extractos de microalga, por su estabilidad térmica y actividad catalítica.
- No se encontró en la literatura información sobre procesos de HDO con extractos de microalgas en los que se reporten perfiles lipídicos completos. Este sería el primer trabajo.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se estudió todo el proceso de producción de bioturbosina a partir de lípidos microalgales, desde el cultivo hasta la reacción de HDO. Esto permitió conocer cómo están relacionadas las diferentes etapas del proceso. En la mayor parte de los trabajos de la literatura se desarrollan estas etapas por separado.

Tomando en cuenta los retos que se abordaron en el presente proyecto, se recomienda para futuros trabajos lo siguiente:

En la etapa de cultivo de la microalga se recomienda continuar estudiando cómo mejorar el rendimiento en biomasa y lípidos, por ejemplo, con la limitación de nitrógeno, el empleo de otras fuentes de carbono, calidad y cantidad de luz, etc.

De igual forma y no menos importante, el desarrollo y/o mejora de un sistema de cosecha de bajo costo para la biomasa microalgal; aportaría un eslabón importante en la cadena de producción.

Continuar con estudios a escalas piloto mayores a 20L, tanto para el cultivo como para la cosecha de la biomasa y la extracción de los lípidos.

Es recomendable continuar con el diseño de catalizadores para procesos de hidrodeshidrogenación y evaluarlos con distintos perfiles de aceites microalgales para el mejoramiento del rendimiento de una bioturbosina que cumpla con las normas internacionales (ASTM y EN)

BIBLIOGRAFIA

- [1] SEPÚLVEDA I. (2012) Bioturbosina. Producción de cultivos energéticos para la aviación comercial. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 579-594.
- [2] WILHELM D. G., M. A. Mandegari, S. Farzad, J. F. Gorgens (2016) Techno-economic comparison of biojet fuel production from lignocellulose, vegetable oil and sugar cane juice. *Bioresource Technology*. 216, 331-339.
- [3] AMEZCUA A.M.A., J.C. Gutiérrez V., J.A. Aburto Anell (2016) Combustibles avanzados de aviación. Instituto Mexicano del Petroleo. 38.
- [4] ARIAS P.M.T., A.J. Martínez R., R.O. Cañizares V. (2013) Producción de biodiésel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biol. Colomb*. 18, 43-68.
- [5] CHISTI Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25, 294-306.
- [6] RAWAT I., R. Ranjith K., T. Mutanda, F. Bux (2013) Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*. 103, 444-467.
- [7] BIAIÑ, P., 2010. Estudio y plan de negocios para el desarrollo de una planta de biorreactores de microalgas. Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Departamento de Ingeniería Industrial. 69p.
- [8] PEREZ-GARCÍA O., Bashan y. & Ester P.M. (2011) Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*. 47,190-199.
- [9] DEMIRBAS A. & M. F. Demirbas (2010) *Algae Energy, Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer-Verlag. London.
- [10] BENEMANN J.R., Dunahay T., Roessler P. & Sheehan J. 1998. A look back at the U.S Department of Energy's Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, U.S.
- [11] SCHNEIDER, Rosana; T.R. Bjerk; P.D. Gressler; M.P. Souza; V.A. Corbellini & E.A. Lobo (2015) Potential production of biofuel from microalgae biomass produced in wastewater. *Biodiesel - Feedstocks, production and applications*.1, 3-24.
- [12] CHEN H., W. Zhou, W. Chen, W. Xie, L. Jiang, Q. Liang, M. Huang, Z. Wu & Q. Wang. 2017. Simplified, rapid, and inexpensive estimation of water primary productivity based on chlorophyll fluorescence parameter F_o . *Journal of Plant Physiology*. 211:128-135.
- [13] BOROWITZKA M.A., J. Beardall, J. A. Raven. Eds. 2016. *The Physiology of Microalgae. Developments in Applied Phycology*. Springer. 673.
- [14] ENAMALA M.K., S Enamala, M. Chavali, J. Donepudi, R. Yadavalli, B. Kolapalli, T.V. Aradhyula, J. Velpuri & C. Kuppam (2018) Production of biofuels from microalgae – A review on cultivation, harvesting, lipid extraction and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 94, 49-68.

- [15] ZHAO C., T. Brück, J.A. Lercher (2013) Catalytic deoxygenation of microalgae oil to green hydrocarbons. *Green Chemistry - Critical Review*. 1697-2012.
- [16] MUBARAK M., A. Shaija, T.V. Suchithra (2014) A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research*. Article in press. 7.
- [17] ROMERO I.A., A. Gómez de la Cruz & C. Gutiérrez-Antonio (2016) Bioturbosina. Retos y oportunidades. *Revista Ciencia*. 7.
- [18] UGGETTI E., F. Passos, M. Solé, J García & I. Ferrer (2016) Biogas from algae via anaerobic digestión. En: Faizal Bux & Yusuf Chisti (eds) *Green Energy and Technology*. Springer.344.
- [19] LIAO Yang (2014) Mixotrophic cultivation of the microalga *Scenedesmus obliquus* with reused municipal wastewater. Tesis de Maestría. Universidad de Arizona. EU.
- [20] GUIRY, M.D. & Guiry, G.M. (2018) AlgaeBase. National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; consultado en 21 November 2018.
- [21] ZHILA, N.O., G.S. Kalacheva y T.G. Volova (2005) Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. *Journal of Applied Phycology*. 17, 309-315.
- [22] MANDAL S. & N. Mallick (2011) Waste utilization and biodiesel production by the green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 77,374-377.
- [23] MAY-CUA E.R. (2015) Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. en un fotobiorreactor acoplado a un sistema de recuperación de biomasa. Tesis de Maestría. CICY. México.
- [24] YAO L.; Gerde J. A.; Lee S. L.; Wang T.; Harrata K. A. (2015) Microalgae lipid characterization. *Journal of Agricultural Food Chem*. 63(6), 1773-1787.
- [25] GUSCHINA I.A. & Harwood L.J. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*. 45,160-186.
- [26] PEDRERO-ALVAREZ. (2017) Cultivo de microalgas en fotobiorreactor de 20 L para la síntesis de bio-keroseno parafínico sintetizado. Tesis de Maestría. CICY. México.
- [27] MANDROTA S.K., P. Kumar, M.R. Suseela, S. Nayaka, P.W. Ramteke (2016) Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology*. 201, 222-229.
- [28] FENG P., K. Yang, Z. Xu, Z. Wang, L. Fan, L. Qin, S. Zhu, C. Shang, P. Chai, Z. Yuan, L. Hu (2014) Growth and lipid acumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. *Bioresource Technology*. 173, 406-414.
- [29] SACRISTÁN DE ALVA M., V.M. Luna-Pabello, E. Cadena, E. Ortíz (2013) Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 146, 744-748.

- [30] MATA T.M., A.C. Melo, S. Meireles, A.M. Mendes, A.A. Martins, N.S. Caetano (2013) Potential of microalgae *S. obliquus* grown in brewery wastewater for biodiesel production. *Chemical Engineering Transactions*. 32, 901-906
- [31] MANDAL S. & N. Mallick (2012) Biodiesel production by the green microalga *Scenedesmus obliquus* in a recirculatory aquaculture system. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(16), 5929-5934.
- [32] TORRENTERA B.L. y A.G.J. Tacon (1989) La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Una diagnosis. FAO-Italia. Online available at: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S00.htm#TOC>
- [33] ABALDE J., A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero (1995) *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de da Coruña. 210.
- [34] GÓMEZ O., R. Rodriguez y S. Subero (2011) Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii*) en medios nutritivos no convencionales. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*. 23(1), 84-90.
- [35] RONSÓN P.J.A. 2010. Modificación de la transferencia de nutrientes en la cadena nutritiva microalga-rotífero y microalga-artemia mediante cambios en la formulación de los nutrientes en el cultivo microalgal. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- [36] SAJJADI B., Wei-Yin C., A. Aziz, A. Raman, S. Ibrahim (2018) Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 97, 200-232.
- [37] COMBRES C, G Laliberté, J S Reyssac & J De La Noüe (1994) Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Physiologia Plantarum*. 91, 729-734.
- [38] GIRARD J M, Marie-Laine R, M B Hafsa, J Gagnon, N Faucheux, M Heitz, R Tremblay & J S Deschènes. (2014) Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research*. 5: 241-248.
- [39] ROSALES-LOAIZA N., M Guevara, C. Lodeiros y E. Morales (2008) Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. *Int. J. Trop. Biol* 56 (2), 421-429.
- [40] FOLEY W. & B. Moore (2005) Plant secondary metabolites and vertebrate herbivores-from physiological regulation to ecosystem function. *Current Opinion in Plant Biology* 8(4), 430-435.
- [41] SUÁREZ-GÓMEZ B.R. 2004. Estudio sobre toxinas marinas de naturaleza polietérea. Aislamiento, elucidación estructural y evaluación de su potencial farmacológico. Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna, España.

- [42] GALADIMA A. & O. Muraza (2015) Catalytic upgrading of vegetable oils into jet fuels range hydrocarbons using heterogeneous catalysts: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 29, 12-23.
- [43] MENG X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34(1), 1–5.
- [44] GARDNER R., P. Peters, B. Peyton & K. E. Cooksey (2010) Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. *J. Appl. Phycol*. 23, 1005-1016.
- [45] SALAZAR-PÉREZ L. E. (2012) Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiésel. Tesis de Doctorado. Universidad de Piura. Perú.
- [46] QIANG H., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert & A. Darzins (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*. 54(4), 621–639.
- [47] HINZPETER I, C. Shene y L. Masson (2006) Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. *International Journal of Fats and Oils*. 57(3), 336-342.
- [48] RUBIO F.D., C. Chica, M. Parra (2013) Obtención de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación. *Rev Elementos*. 3, 111-119.
- [49] BARRAZA C., V. Collao, C. Espinoza, F. Moya, G. Thun & M. Torres (2009) Producción de biodiésel a partir de microalgas. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. 26.
- [50] AULLON A.A. (2010) Biodiesel from microalgae. Tesis de grado. Royal School of Technology. Stockholm, Suecia. 92.
- [51] ABALDE, J., Herrero, C. (2004) Microalgas en acuicultura: calidad nutricional. *ALGAS Boletín de la Sociedad Española de Ficología*. (32), 16-18.
- [52] ELRAYIES G.M. 2018. Microalgae: Prospects for greener future buildings. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 81:1175-1191pp.
- [53] BATISTA A.P., P. Moura, P.A.S.S. Marques, J. Ortigueira. L. Alves, L. Gouveia (2014) *Scenedesmus obliquus* as a feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel*. 117, 537-543.
- [54] MURIANA V.V.M. (2016) Planta de producción de biodiésel a partir de microalgas. Tesis de Maestría. Universidad de Sevilla. España.
- [55] DEMIRBAS A. (2005) Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress in Energy and Combustion Science*. 31, 466-487.
- [56] BALAT, M. (2009) New biofuel production technologies. *Energy Educ Sci Technol Part A*. 22, 147-161.

- [57] ARO E M. (2016) From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio, A Journal of the Human Environment*. Springer. 45, 24-31.
- [58] HERRERA-GARCIA A. & N.A. Vales-Cordero (2013) Estimación de las emisiones de gases contaminantes generadas por la actividad aérea en México. Instituto Mexicano del Transporte.
- [59] NYGREN E., Aleklett K., Höök M. (2009) Aviation fuel and future oil production scenarios. *Energy Policy*. 37(10), 4003-4010.
- [60] WILHELM G.D., M.A. Mandegari, S. Fazard, J.F. Görgens (2016) Techno-economic comparison of biojet fuel production from lignocellulose, vegetable oil and sugar cane juice. *Bioresource Technology*. 216, 331-339.
- [61] VIGUIÉ J.C., N. Ullrich, P. Porot, L. Bournay, M. Hecquet & J. Rousseau (2013) BioTfuel Project: Targeting the development of second-generation biodiesel and biojet fuels. *Oil & Gas Science and Technology. IFP Energias nouvelles*. 68(5), 935-946.
- [62] WESOFF E. (2014) VC-funded developer of green chemicals from genetically modified organisms finds a new home. *Greentech Media Magazine*. Consultado en agosto 2018
<https://www.greentechmedia.com/articles/read/REG-Acquires-LS9-Green-Biochemicals-Firm-For-61M>
- [63] WANG W-C & L Tao (2016) Bio-jet fuel conversion technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier. 53, 801-822.
- [64] WANG H., J Male & Y. Wang. 2013. Recent advances in hydrotreating of pyrolysis bio-oil and its oxygen-containing model compounds. *ACS Catalysis* 3(5), 1047-1070.
- [65] GONZALEZ R. C. 2014. Hidrodesoxigenación de compuestos aromáticos oxigenados sobre catalizadores de metal precioso soportado. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Asturias, España.
- [66] AMEEN M., M. Tazli, S Yusup, A. Ramli & M. Yasir (2017) Catalytic hydrodeoxygenation of triglycerides: An approach to clean diesel fuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier. 1072-1088.
- [67] PATTANAIK B.P. & R.D. Misra (2017) Effect of reaction pathway and operating parameters on the deoxygenation of vegetable oils to produce diesel range hydrocarbon fuels: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 73, 545-557.
- [68] KALNES T., T. Marker & D.R. Shonnard (2007) Green Diesel: A second generation Biofuel. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 5, 48.
- [69] CONTRERAS B.J.R., J.C. Chavarria H., R. Cuevas G.R., A. Gutiérrez A., M. Castro G., C. Salcedo L., I. Puente L. (2015). Preparación, caracterización y evaluación de catalizadores Ni(%peso)/ZSM-22Mes-Al₂O₃ para la hidrodesoxigenación de ácido oleico. *Superficies y Vacío. Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*. 28(2), 48-53.
- [70] WEITKAMP J. (1999) Zeolites and catalysis. *Solid State Ionics*. 131, 175-188.

- [71] LAURINO C. & B. Palmieri (2015) Zeolite: "the magic stone", main nutritional, environmental, experimental and clinical fields of application. *Nutr Hosp.* 32(2), 573-581.
- [72] DEL CAMPO, P., P. Beato, F. Rey, M. Teresa N., U. Olsbye, K. Petter L., S. Svelle., (2018) Influence of post-synthetic modifications on the composition, acidity and textural properties of ZSM-22 zeolite. *Catalysis Today.* 299, 120-134.
- [73] BOSCH P. & I. Schifter (1997) La zeolita una piedra que hierve. *Fondo de cultura económica.* 1, 55.
- [74] SCHASCHKE, Carl. (2014) Dictionary of Chemical Engineering. Oxford University Press.432. <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpDCE00021/dictionary-chemical-engineering/dictionary-chemical-engineering>
- [75] KEBIN C., Z. Zhen, T. Zhijian, H. Sheng, Y. Lijun, L. Tianshu, W. Bingchun, M. Xiangbin, G. Shabin, T. Mingwei & L. Yanfeng (2013) Hydroisomerization performance of platinum supported on ZSM-22/ZSM-23 intergrowth zeolite catalyst. *Petroleum Science* 10(2), 242-250.
- [76] SIMON W.M., S.L. Suib & Chi-Li O'Y. (1994) Synthesis and characterization of ZSM-22 zeolites and their catalytic behavior in 1-butene isomerization reactions. *Journal of catalysis.* 147, 484-493.
- [77] ARREDONDO-VEGA, B.O. & D. Voltolina (Eds) (2007) Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. CIBNOR. México.
- [78] BLIGH G.E., & Dyer J.W. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology.* 37(3), 911-917.
- [79] HEGEWALD E. & M. Wolf. 2003. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparisons. *Plant Syst. Evol.* 241: 185-191pp
- [80] TSARENKO, P. M. & Petlovanny, O. A. (2001) Diversity of algae in Ukraine. *Algologia Suppl. (Unnumbered).* 1–130
- [81] WYNNE J.M. & J.K. Hallan. (2015) Reinstatement of *Tetradesmus* G.M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repertorium.* 126, 83-86.
- [82] DI CAPRIO F. P., R.H. Wijffels, D. Van der Veen (2018) Quantification of *Tetradesmus obliquus* (Chlorophyceae) cell size and lipid content heterogeneity at single-cell level. *J. Phycol.* 54, 187-197.
- [83] ISMAGULOVA T., K. Chekanov, O. Gorelova, O. Baulina, L. Semenova, I. Selyakh, O. Chivkunova, E. Lobakova, O. Karpova, A. Solovchenko (2018) A new subartic strain of *Tetradesmus obliquus* – Part I: Identification and fatty acid profiling. *J Appl Phycol.* 30, 2737-2750.
- [84] SCHERBAKOV p., T. Ismagulova, T. Chernov., O. Gorelova, I. Selyakh, L. Semenova, O. Baulina, O. Chivkunova, E. Lobakova, A. Solovchenko (2018) A new subartic strain of

Tetrademus obliquus – Part II: Comparative studies of CO₂-stress tolerance. J Appl Phycol. 30, 2751-2761.

- [85] CASTILLO, O. S., S. G. Torres-Badajoz, C. A. Núñez-Colín, V. Peña-Caballero, C. H. Herrera Méndez y J. R. Rodríguez-Núñez (2017) Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. Hidrobiológica 27 (3), 337-352.
- [86] CARRERES B.M., L. de Jaeger, J. Springer, M.J. Barbosa, G. Breuer, E.J. van den End, D.M.M. Kleinegris, I. Schäffers, E.J.H. Wolbert, H. Zhang, P.P. Lamers, R.B. Draaisma, V.A.P. Martins dos Santos, R.H. Wijffels, G. Eggink, P.J. Schaap, D.E. Martens. 2017. Draft genome sequence of the oleaginous green alga *Tetrademus obliquus* UTEX 393. Genome Announc. 5:e01449-16 . <https://doi.org/10.1128/genomeA.01449-16>
- [87] BUONO S., A. Colucci, A. Angelini, A. L. Langellotti, M. Massa, A. Martello, Vincenzo F, a. Dibenedetto. 2016. Productivity and biochemical composition of *Tetrademus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum*: effects of different cultivation approaches. J. Appl. Phycol. 28:3179-3192.
- [88] NANDUCA N.H.E. (2015) Utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en el cultivo de la microalga *Scenedesmus sp.* para la producción de lípidos. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México.
- [89] SERRANO-VÁZQUEZ, Ma Guadalupe del Rayo (2017) Análisis del perfil lipídico de la microalga *Coelastrum sp.* para la producción de biocombustibles. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México.
- [90] TRIPATHI R, J Singh, I Shekhar T. (2015) Characterization of microalga *Scenedesmus sp.* ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. Renewable Energy. 74, 774-781.
- [91] MIN-KYU J., Hyun-Shik Y., Young-Tae P., A.N. Kabra, In-Hwan O., J. Choi (2015) Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO₂ for biomass production. Journal of Environmental Management. 159, 115-120.
- [92] FAJARDO C E E & A C Sarmiento F. (2007) Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. 120.
- [93] RAVEN J A, M Giordano. Nutrients and their acquisition: N sources. In. Borowitzka M A, J Beardall & J A Raven (2016) The physiology of microalgae. Springer. 673.
- [94] SERPA I.R.F. & A Calderón R. (2006) Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de carotenoides y clorofila de cuatro cepas peruanas de *Dunaliella salina* Teod. Ecología Aplicada. 5, 93-99.
- [95] BAGNATO C. (2013) Técnicas biofísicas para el estudio de lípidos y membranas. En Análisis estructural y funcional de macromoléculas. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.

- [96] LÓPEZ-ROSALES A.R. (2017) Potencial de cepas de microalgas aisladas de la costa de Yucatán para la producción de biodiesel. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- [97] SOTO-LEON S, I E Zazueta-Patrón, P Piña-Valdez, M Nieves-Soto, C Reyes-Moreno e I Contreras-Andrade (2014) Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: Proceso asistido por ultrasonido y solventes. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 13(3), 723-737.
- [98] HIELSCHER. Ultrasonic Technology (2015) Los ultrasonidos mejoran la eficiencia del procesamiento de biodiésel. Consultado en Noviembre de 2018
https://www.hielscher.com/es/biodiesel_processing_efficiency.htm
- [99] BROCKS J J, A J M Jarret, E Sirantoine, C Hallmann, Y Hoshino & T Liyanage (2017) The rise of algae in cryogenian oceans and the emergence of animals. Nature. 548, 578-581.
- [100] RONTANI J-F & J K Volkman (2003) Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. Organic Geochemistry. 34, 1-35.
- [101] HEINRICH J.M. (2016) Producción de microalgas con fines alimenticios y energéticos. Tesis de maestría. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.
- [102] TRACY N I, D W Crunkleton, G L Price (2010) Gasoline production from phytol. Fuel. 89, 3493-3497.
- [103] JIMENEZ-DIAZ L, A Caballero, N Pérez-Hernández & A Segura (2016) Microbial alkane production for jet fuel industry: motivation, state of the art and perspectives. Microbial Biotechnology. 10, 103-124.
- [104] NZAI J.M. & A. Proctor (1998) Determination of Phospholipids in vegetable oil by fourier transform infrared spectroscopy. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75, 1281-1289.
- [105] NAVEENJI A, R V Sharma & A K Dalai (2015) Green diesel synthesis by hydrodeoxygenation of bio-based feedstocks: Strategies for catalyst design and development. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 48, 240-255.
- [106] ADVANCE CHEMICALS SUPPLIER MATERIAL® (2018) ACS Material ZSM-22. Technical Data Sheet. Consultado el febrero de 2018 www.acsmaterial.com/zsm-3262.html.
- [107] HIDALGO C J. (2011) Sistemas de platino soportado aplicados a hidrogenación y fotooxidación selectivas. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. España.
- [108] CONDON J.B. (2006) Surface área and porosity determinations by physisorption. Measurements and Theory. Elsevier. 297.
- [109] MARTENS J.A., Verboekend D., Thomas K., Vanbutsele G., Pérez-Ramírez J., Gilson J.P. (2013) Hydroisomerization and hydrocracking of linear and multibranched long model alkanes on hierarchical Pt/ZSM-22 zeolite. Catal. Today. 218, 135-142.

- [110] KUMAR A.V. (2014) Crossover from normal diffusion to single-file diffusion of particles in a one-dimensional channel:LJ particles in zeolite zsm-22. *Molecular Physics*. 113(11), 1306-1310.
- [111] CHAIVE T.R.Z. (2016) Síntesis y caracterización de zeolitas con estructura jerárquica de poros como potenciales materiales para la generació de aromáticos. Tesis de Maestría. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- [112] LEE C.H. (2003) Adsorption Science and Technology. Proceedings of the Third Pacific Basin Conference. Kyongju, Korea. World Scientific.
- [113] LIU G., Yan B & Chen G. (2013) Technical review on jet fuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 25, 59-70.
- [114] GUTIÉRREZ-ANTONIO C., A.G. Romero-Izquierdo, F.I. Gómez-Castro & S. Hernández (2016) Energy integration of a hydrotreatment process for sustainable biojet fuel production. *Ing. Eng. Chem. Res.* 55, 8165-8175.
- [115] LANG A. & H Farouk A E. (2014) The worldwide production of bio-jet fuels – The current developments regarding technologies and feedstocks and innovative new R&D developments. *ResearchGate Technical Report*. 60.
- [116] RODRIGUEZ-LIZAMA F.V. (2017) Síntesis de un catalizador bifuncional para (hidro)desoxigenación de aceites. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- [117] WANG C, Z Tian, L Wang, R Xu, Q Liu, W Qu, H Ma, B Wang (2013) One-Step hydrotreatment of vegetable oil to produce high quality diesel-range alkanes. *ChemSusChem*. 1-11.

ANEXOS

A. Protocolo para la extracción de lípidos microalgales

Basado en Bligh & Dyer (1959), modificado para la extracción de compuestos lipídicos de microalgas (Arredondo-Vega, 2007). Utilizando una mezcla $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, cloroformo:metanol (2:1 v/v), para la extracción de lípidos totales (polares y no polares) [78].

- Se pesa entre 5 y 50 mg de microalga liofilizada por triplicado en tubo de vidrio de 15 mL
- Se adicionará 3 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$.
- Se sonica por 15 minutos (3 ciclos) en un baño de agua con hielo.
- Se incuban los tubos al menos 24 h a 4 °C y protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- Se vuelve a sonicar otros 15 minutos (3 ciclos) en frío antes de centrifugar.
- Se centrifugan los tubos a 5000 rpm por 20 min a 5 °C. y se recuperará el extracto con una pipeta pasteur; pasándolo a un tubo de vidrio de 15 mL.
- Se agrega 1.5 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) a la biomasa residual, se agita en vortex y centrifuga nuevamente a 5000 rpm por 20 min a 5 °C, recuperando el extracto.
- Se seca el extracto del tubo 2 con nitrógeno gaseoso (1 psi aprox.) y posteriormente se determina el peso seco.
- Se retira el solvente utilizando un rotavapor y se recupera el extracto en un vial previamente pesado.
- Una vez pesado, se agregan 2 mL de agua destilada al tubo, que contiene el extracto, se agita con vortex.
- Se adicionan 4 mL de cloroformo, se agita con vortex y se deja reposar para dar tiempo a que se formen dos fases o en su defecto de centrifuga (5000 rpm por 20 min a 5 °C) para posteriormente recuperar la fase inferior (CHCl_3 :lípido), introduciendo con cuidado una pipeta pasteur y burbujeando aire hasta el fondo del tubo. Se coloca la fase CHCl_3 :lípido en un tubo de 10 mL.
- Se lava la fase acuosa (superior) con 1 mL de CHCl_3 , mezclar con el vortex y centrifugar nuevamente a 5000 rpm durante 10 minutos, al final se recupera la fase inferior (CHCl_3 :lípido).
- Por último se seca la fase CHCl_3 :lípido en la campana de extracción con nitrógeno gaseoso. Y se procede a la cuantificación de lípidos totales.

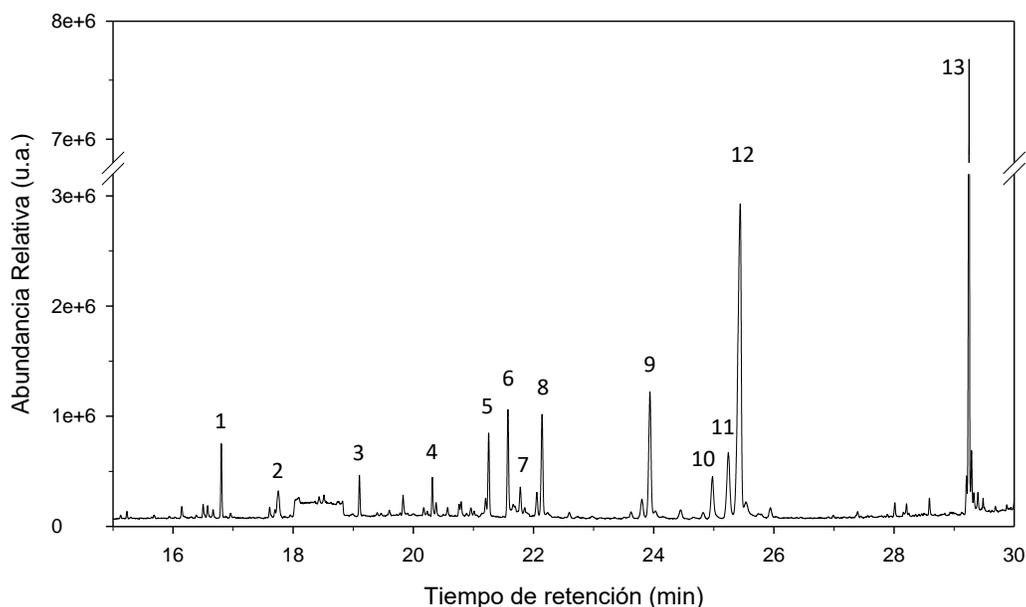
B. Cromatografías de las fracciones del extracto microalgal

Se presentan los cromatogramas realizados en CG-EM, de las 8 fracciones que se lograron diferenciar por cromatografía en columna por gravedad; a partir del extracto de *Scenedesmus obliquus*.

Fracción 1

Composición lipídica de la fracción 1

#	RT (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% AREA TOTAL
1	16.807	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	Ester metílico del ácido dodecanoico	0.169
2	17.754	C ₁₇ H ₃₆	Heptadecano	0.139
3	19.103	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	Metilo de tetradecanoato	0.097
4	20.316	C ₂₀ H ₃₈	Neofitadieno	0.096
5	21.251	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Ester metílico del ácido hexadecanoico	0.235
6	21.574	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	Metilo de 4,7,10,13-hexadecatetraenoato	0.339
7	21.778	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Etilo de 9-hexadecenoato	0.080
8	22.056	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Etil 9-hexadecenoato - Isomero	0.079
9	23.938	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	Ester metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	0.581
10	24.981	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	Metilo de 8,11,14,17-eicosatetraenoato	0.240
11	25.242	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	Ester etílico del ácido Linoleico	0.408
12	25.44	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	Ester etílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	2.025
13	29.25	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ftalato de bis(2-etilhexilo) DEHP	1.564

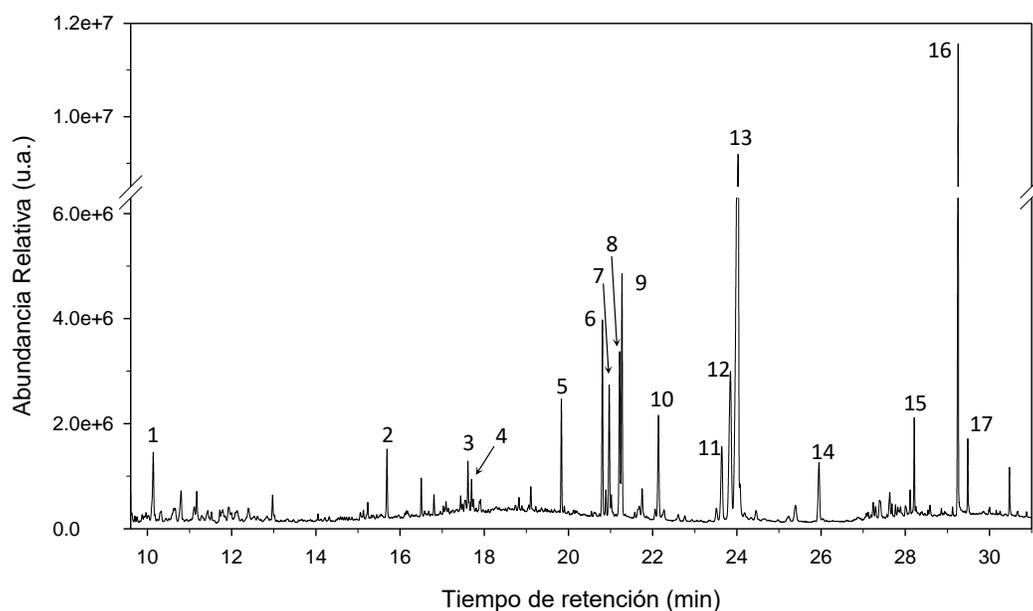


Cromatograma de la fracción 1 del extracto microalgal; en su mayoría compuestos ésteres de metilo de ácido graso

Fracción 2

Composición lipídica de la fracción 2

#	RT (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% AREA TOTAL
1	10.135	C ₂ Cl ₆	Hexacloroetano	0.578
2	15.69	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	Ester metílico del ácido 9-oxo-nonanoico	0.392
3	17.612	C ₂₀ H ₄₀	3-Eicoseno	0.285
4	17.697	C ₁₂ H ₂₆	3,8-Dimetildecano	0.162
5	19.834	C ₁₉ H ₃₈	1-Nonadeceno	0.547
6	20.809	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	Metilo de 4,7,10,13-hexadecatetraenoato	1.059
7	20.968	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	Ester metílico del ácido 7-hexadecenoico	0.802
8	21.217	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	Ester metílico del ácido 9-hexadecenoico	1.107
9	21.274	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Ester metílico del ácido 14-metil pentadecanoico	1.410
10	22.135	C ₂₀ H ₄₀	9-Eicoseno	0.757
11	23.643	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	Metilo de 8,11,14,17-eicosatetraenoato	0.762
12	23.847	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	Ester metílico del ácido 9,12-octadecadienoico	2.021
13	24.029	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	Ester metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	7.037
14	25.95	C ₂₀ H ₄₀	9-Eicoseno	0.568
15	28.212	C ₂₄ H ₄₈	Ciclotetracosano	0.390
16	29.255	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ftalato de bis(2-etilhexilo) DEHP	2.853
17	29.482	C ₂₂ H ₄₄	1-Docoseno	0.331

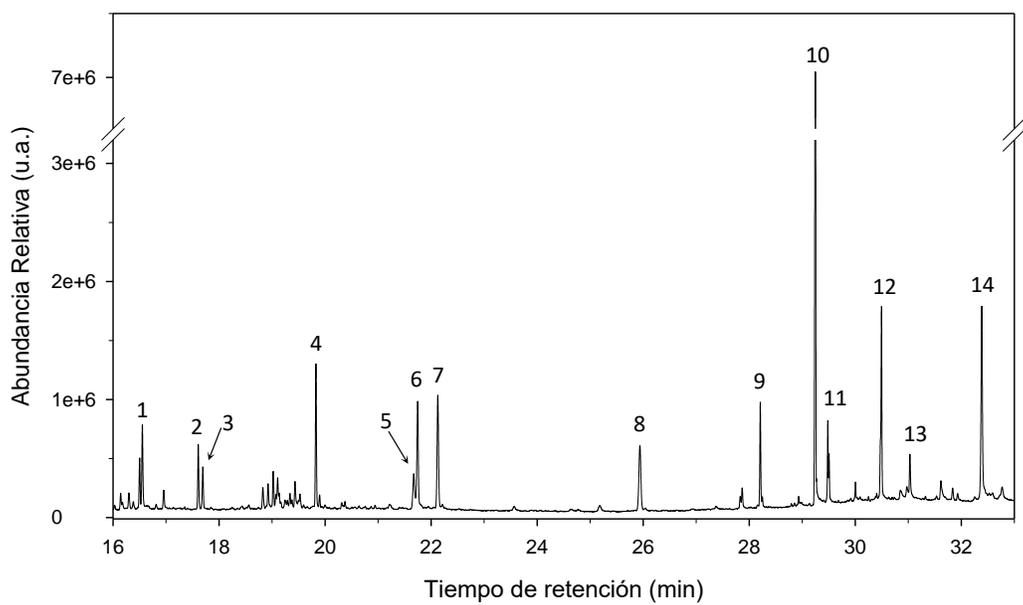


Cromatograma de la Fracción 2 del extracto microalgal

Fracción 3

Perfil de compuestos de la fracción 3

#	RT (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% AREA TOTAL
1	16.501	C ₁₅ H ₃₂	Trimetil 2,6,10-dodecano; Farneseno	0.105
2	17.606	C ₁₆ H ₃₂	7-Hexadeceno	0.136
3	17.697	C ₁₆ H ₃₄	Hexadecano	0.099
4	19.828	C ₁₈ H ₃₆	5-Octadeceno	0.301
5	21.671	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido Hexadecanoico, Acido Palmítico	0.132
6	21.744	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	Ftalato de dibutilo DBP	0.347
7	22.124	C ₂₀ H ₄₀	3-Eicoseno	0.354
8	25.939	C ₁₉ H ₃₆	1-Nonadeceno	0.278
9	28.207	C ₂₄ H ₄₈	1-Tetracoseno	0.196
10	29.25	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ftalato de bis(2-etilhexilo) DEHP	1.546
11	29.482	C ₂₆ H ₅₂	1-Hexacoseno	0.149
12	30.497	C ₂₄ H ₅₀	Tetracosano	0.463
13	31.03	C ₃₀ H ₆₀	13-Metil-Z-14-nonacoseno	0.115
14	32.384	C ₂₄ H ₄₈	Ciclotetracosano	0.625

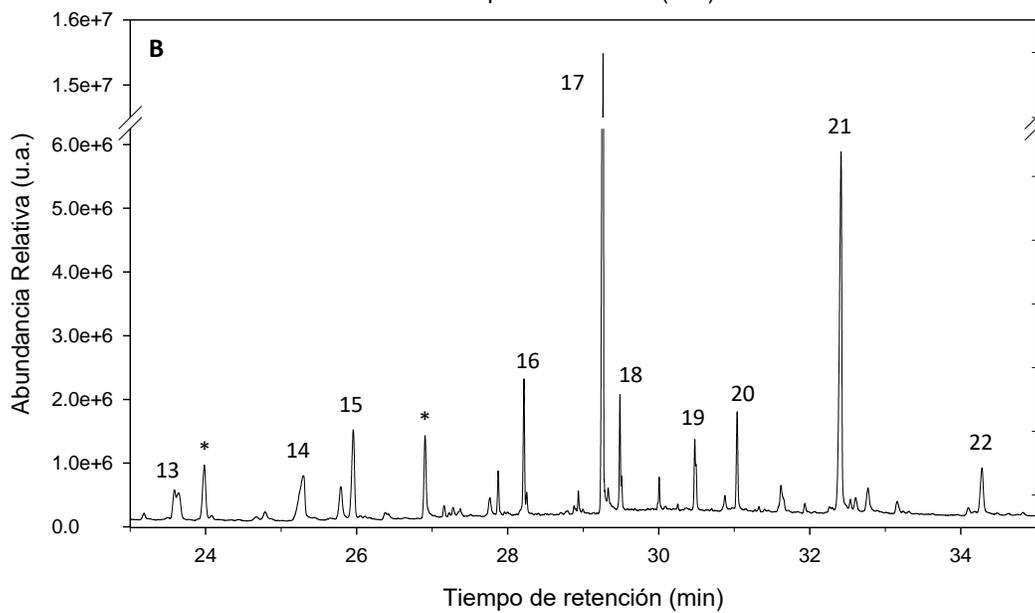
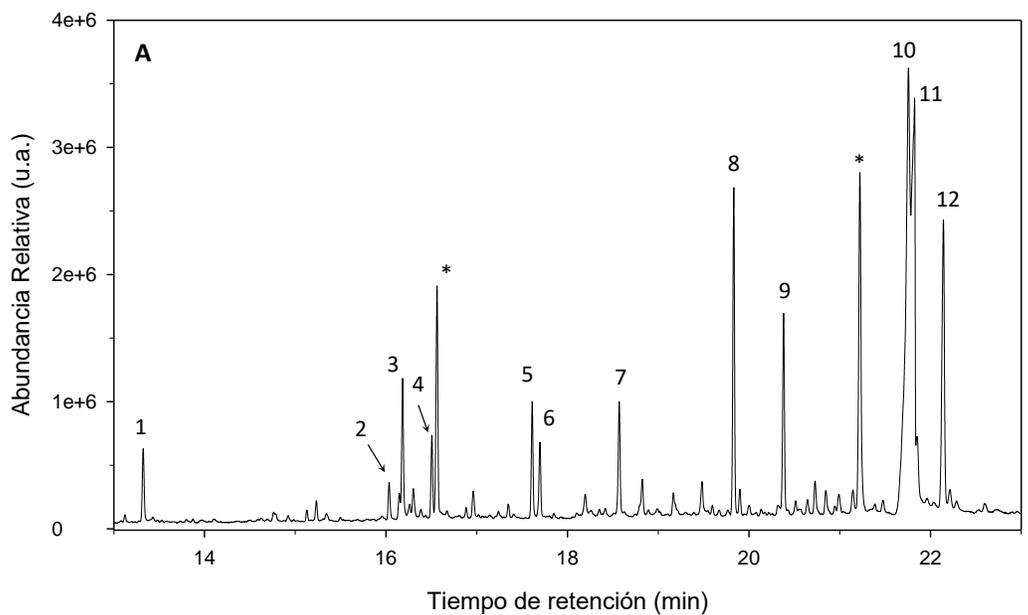


Cromatograma de la Fracción 3 del extracto microalgal

Fracción 4

Perfil de compuestos de la Fracción 4

#	RT (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% AREA TOTAL
1	13.326	C ₁₀ H ₁₈ O	2-Decenal	0.154
2	16.036	C ₁₅ H ₃₂	Trimetilo de 2,6,10-dodecano; Farneseno	0.083
3	16.183	C ₁₀ H ₂₀	1-Deceno	0.269
4	16.506	C ₂₀ H ₄₂	10-Metilnonadecano	0.161
5	17.612	C ₁₆ H ₃₂	7-Hexadeceno	0.226
6	17.697	C ₁₆ H ₃₄	Hexadecano	0.161
7	18.57	C ₁₄ H ₂₈	4-Tetradeceno	0.236
8	19.834	C ₁₈ H ₃₆	9-Octadeceno	0.643
9	20.384	C ₁₈ H ₃₆ O	Trimetilo de 6,10,14-2-pentadecanona, Fitona	0.392
10	21.756	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	Ftalato de dibutilo DBP	2.472
11	21.824	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido Hexadecanoico, Acido Palmítico	13.003
12	22.141	C ₂₀ H ₄₀	3-Eicoseno	0.807
13	23.587	C ₁₈ H ₃₆	3-Octadeceno	0.228
14	25.293	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido octadecanoico, Acido Esteárico	0.723
15	25.956	C ₂₀ H ₄₀	9-Eicoseno	0.675
16	28.218	C ₂₄ H ₄₈	1-Tetracoseno	0.566
17	29.261	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ftalato de bis(2-etilhexilo) DEHP	3.995
18	29.488	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	Formiato de 1-heneicosilo	0.468
19	30.48	C ₃₅ H ₇₀	17-Pentatriaconteno	0.398
20	31.041	C ₃₀ H ₆₀	13-Metil-Z-14-nonacoseno	0.430
21	32.413	C ₂₄ H ₅₀ O	1-Tetracosanol	2.434
22	34.283	C ₃₀ H ₆₀	13-Metil-Z-14-nonacoseno (isomero)	0.412

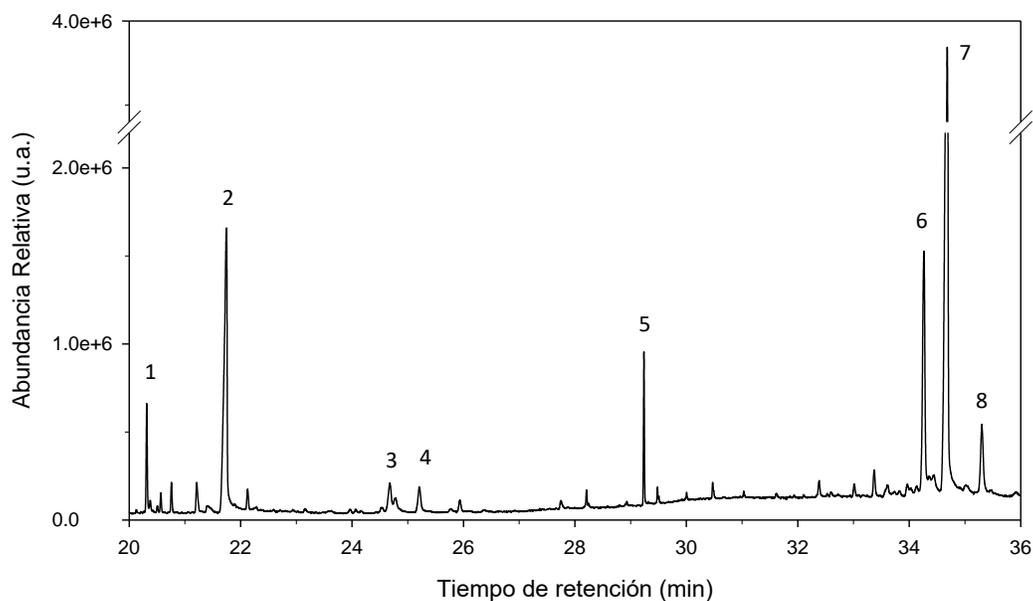


Cromatograma de las fracciones 4. Se presentan con (*) los picos que no pudieron ser identificados

Fracción 5

Perfil de compuestos de la fracción 5

#	RT (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% AREA TOTAL
1	20.316	C ₂₀ H ₃₈	Neofitadieno	0.167
2	21.744	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido Hexadecanoico, Acido Palmítico	1.221
3	24.681	C ₁₈ H ₃₂ O	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	0.124
4	25.208	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido octadecanoico, Acido Esteárico	0.105
5	29.238	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ftalato de bis(2-etilhexilo) DEHP	0.189
6	34.266	C ₃₁ H ₅₆ OSi	(3 β) Ergost-7-en-3-ol	0.754
7	34.68	C ₂₉ H ₄₈ O	Chondrillasterol	2.564
8	35.304	C ₂₉ H ₄₈ O	(3 β , 5 α) Stigmast-7-en-3-ol	0.238

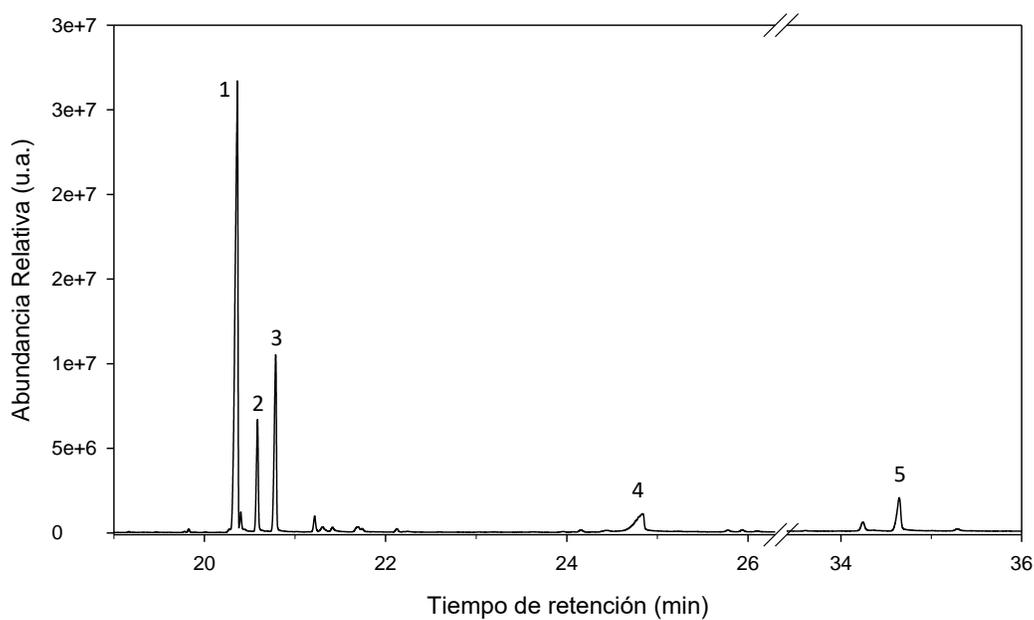


Cromatografía de gases de la fracción 5

Fracción 6

Perfil de compuestos de la fracción 6

#	RT (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% AREA TOTAL
1	20.361	C ₂₀ H ₃₈	Neofitadieno	10.891
2	20.588	C ₂₀ H ₄₀ O	3,7,11,15-tetrametilo-2-hexadecen-1-ol (fitol)	1.851
3	20.786	C ₂₀ H ₄₀ O	3,7,11,15-tetrametilo-2-hexadecen-1-ol (ISOMERO)	3.395
4	24.839	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Acido 9,12,15-octadecatrienoico; ácido alfa-linolénico	1.302
5	34.646	C ₂₉ H ₄₈ O	(3 β , 5 α) Stigmasta-7,16-dien-3-ol	1.229

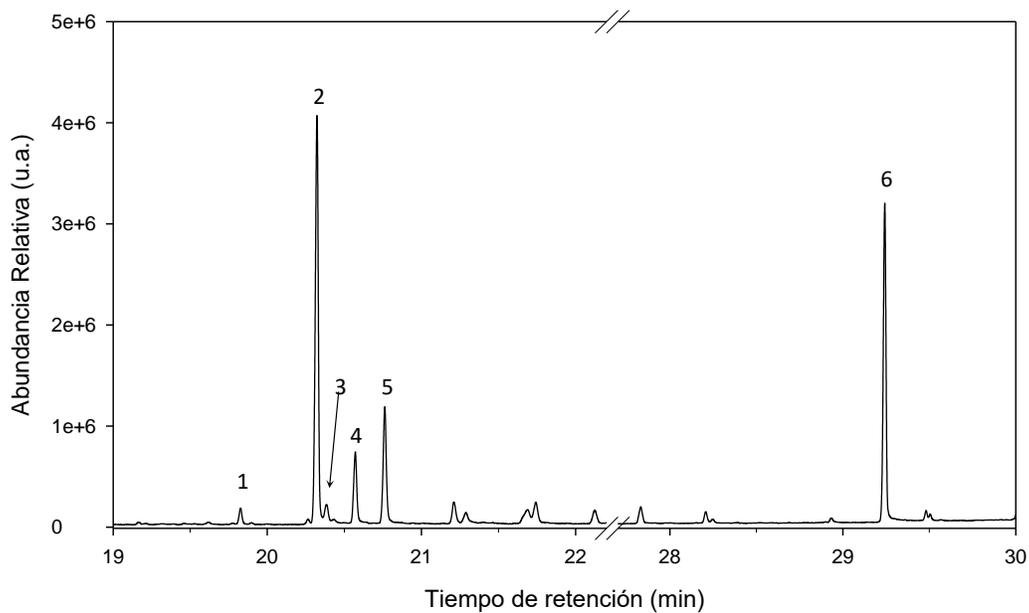


Cromatografía de gases de la fracción 6

Fracción 7

Perfil de compuestos de la fracción 7

#	RT (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% AREA TOTAL
1	19.828	C ₂₀ H ₄₀	3-Eicoseno	0.041
2	20.322	C ₂₀ H ₃₈	Neofitadieno	1.048
3	20.384	C ₂₀ H ₄₀	3,7,11,15-tetrametilo-2-hexadeceno	0.048
4	20.571	C ₂₀ H ₄₀ O	3,7,11,15-tetrametilo-2-hexadecen-1-ol (fitol)	0.196
5	20.764	C ₂₀ H ₄₀ O	3,7,11,15-tetrametilo-2-hexadecen-1-ol (ISOMERO)	0.320
6	29.244	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ftalato de bis(2-etilhexilo) DEHP	0.686

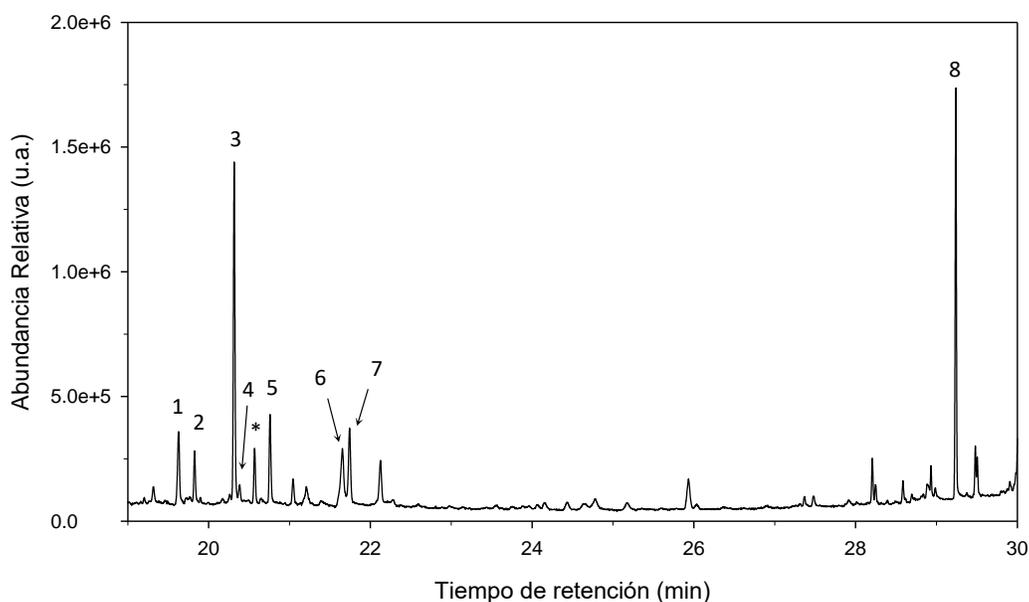


Cromatograma de la fracción 7

Fracción 8

Perfil de compuestos de la fracción 8

#	TR (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% AREA TOTAL
1	19.63	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	6-Hydroxy-4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-ona	0.101
2	19.828	C ₁₈ H ₃₆	5-Octadeceno	0.055
3	20.316	C ₂₀ H ₃₈	Neofitadieno	0.351
4	20.384	C ₂₀ H ₄₀	3,7,11,15-tetrametilo-2-hexadeceno	0.020
5	20.758	C ₂₀ H ₄₀ O	3,7,11,15-tetrametilo-2-hexadecen-1-ol (ISOMERO)	0.099
6	21.654	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido Hexadecanoico, Acido Palmítico	0.132
7	21.744	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	Ftalato de dibutilo DBP	0.114
8	29.238	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ftalato de Bis(2-etilhexilo) DEHP	0.349



Cromatograma de la fracción 8

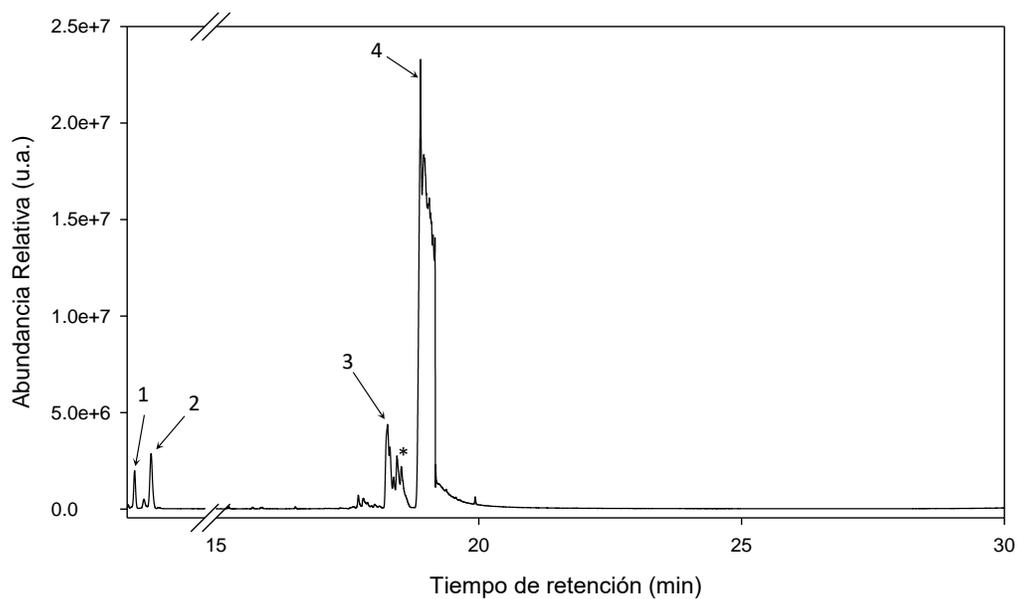
C. Hidrodesoxigenación de estándares

Se presentan el listado de compuestos y las cromatografías de los productos de reacción resultantes de las reacciones de hidrodesoxigenación de las moléculas que sirvieron como estándar.

Heptadecano

Perfil de compuestos de la HDO de heptadecano

#	TR (MIN)	COMPUESTO	% AREA TOTAL
1	4.078	1-etil-2-metil cis-ciclopentano	2.2
2	4.248	Propil-ciclopentane	4.4
3	18.528	2,6,10-trimetil tetradecano	8.0
4	18.891	Heptadecano	67.2

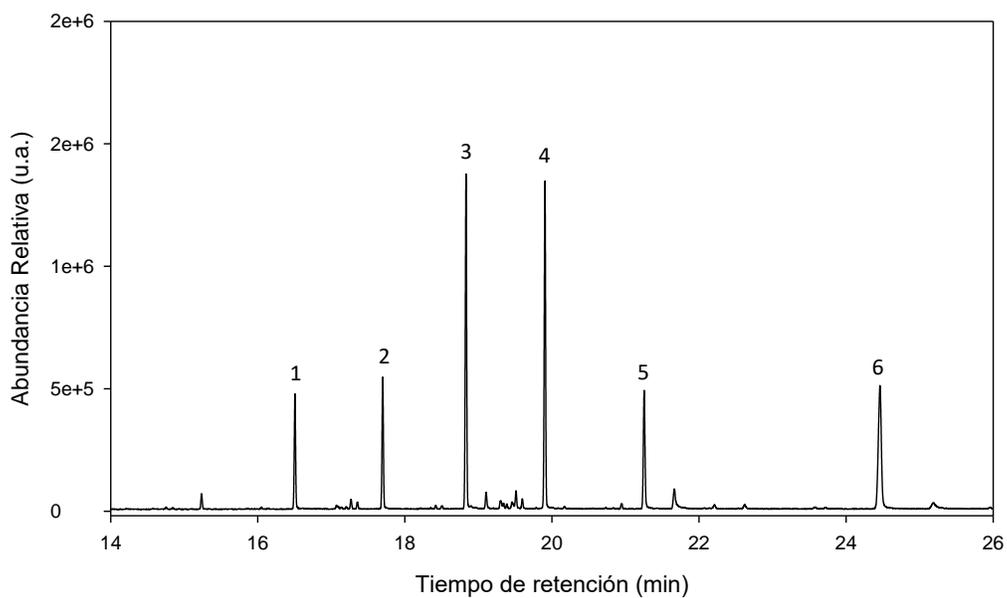


Cromatograma de los productos de reacción de la HDO del heptadecano

Triestearina

Perfil de compuestos de la HDO de la triestearina

#	TR (MIN)	COMPUESTO	% AREA TOTAL
1	16.507	Pentadecano	8.5
2	17.697	Hexadecano	10.0
3	18.831	7-metil hexadecano	25.0
4	19.908	8-metil heptadecano	24.7
5	21.257	Éster metílico de ácido-14-metil pentadecanoico	10.9
6	24.46	Éster metílico de ácido esteárico	20.9

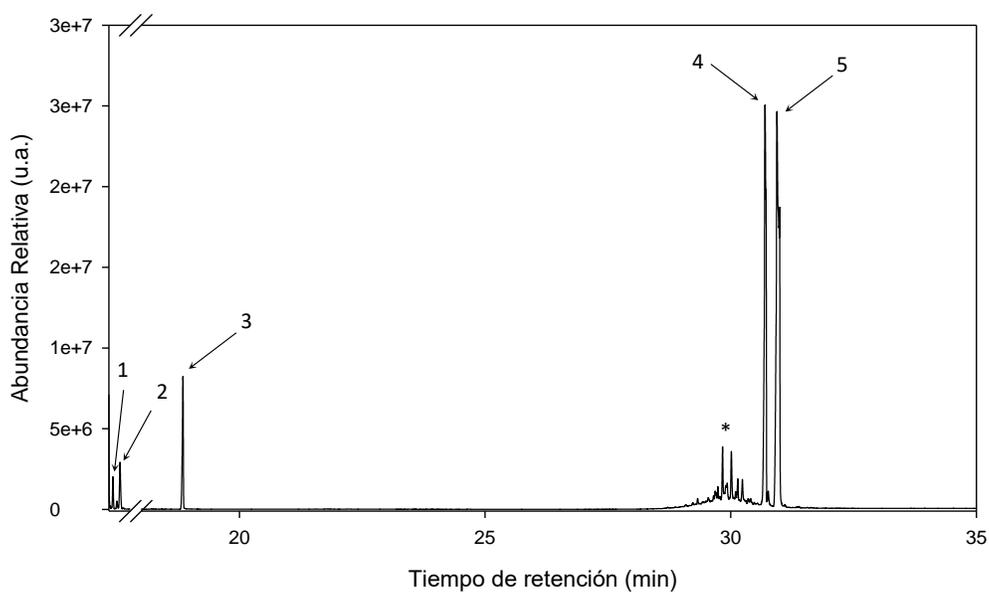


Cromatograma de los productos de reacción del HDO de la triestearina

Colesterol

Perfil de compuestos de la HDO del colesterol

#	TR (MIN)	COMPUESTO	% AREA TOTAL
1	4.094	1-etil-2-metil cis-ciclopentano	1.4
2	4.264	Propil-ciclopentano	2.8
3	18.849	Hexadecano	6.3
4	30.697	Coprostano	32.9
5	30.941	Colestano	51.4

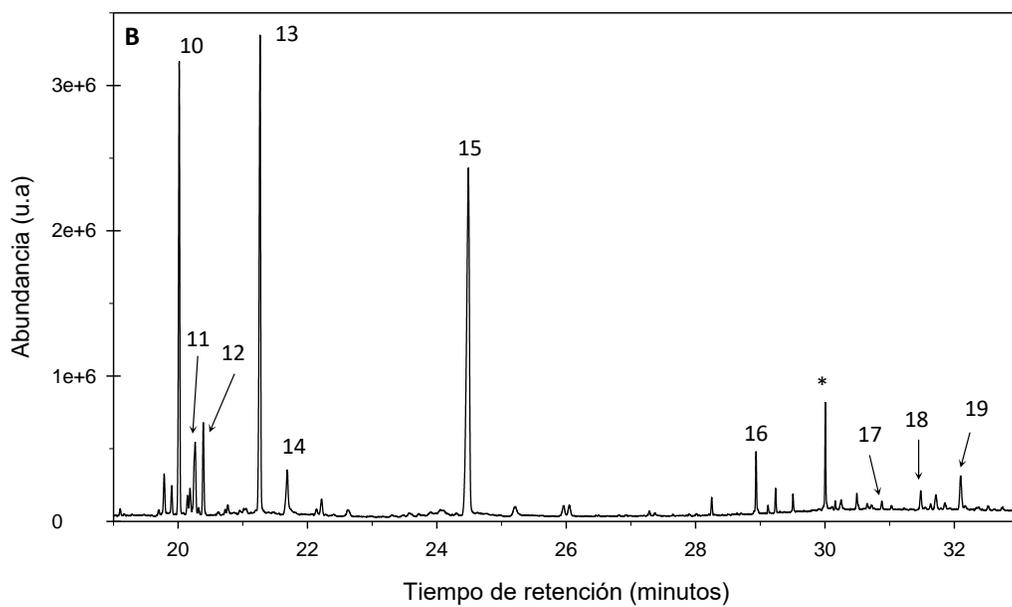
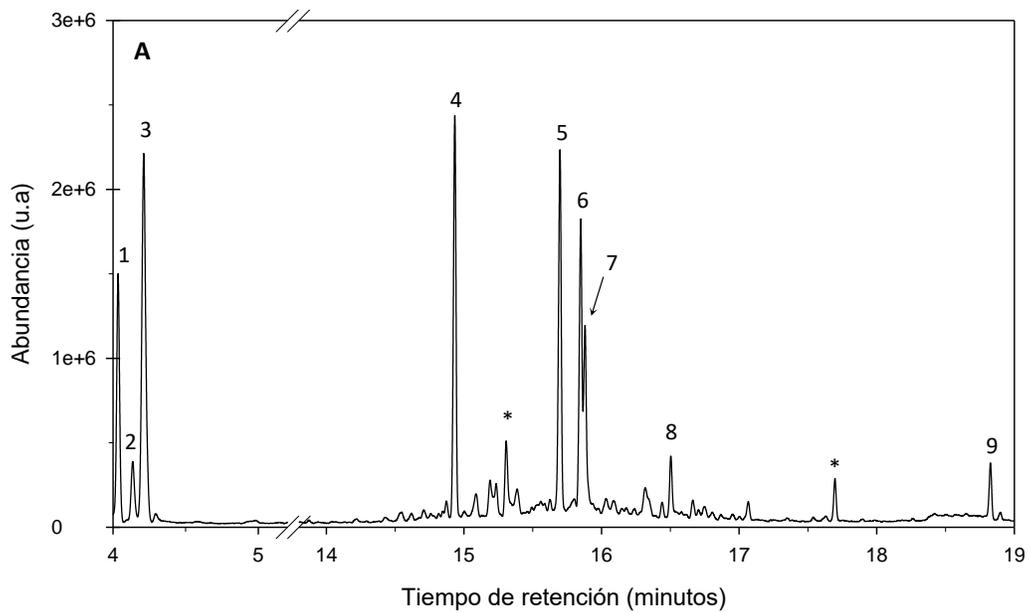


Cromatograma de los productos de reacción de la HDO del colesterol

D. Hidrodesoxigenación de lípidos de *S. obliquus*

Se presenta el perfil de compuestos y el cromatograma de los productos de reacción resultado de la catálisis del extracto microalgal.

#	RT (MIN)	FORMULA	NOMBRE	% AREA TOTAL
1	4.036	C ₈ H ₁₆	1-etil-2-metilciclopentano	4.721
2	4.138	C ₈ H ₁₆	1,2-dimetilciclopentano	1.420
3	4.211	C ₈ H ₁₆	Propilciclopentano	9.363
4	14.931	C ₁₅ H ₃₂	Trimetilo de 2,6,10-dodecano; Farnesano	7.133
5	15.696	C ₁₅ H ₃₀	1-(1,5-dimetilhexil)-4-metilciclohexano	6.704
6	15.849	C ₁₀ H ₂₀	1-metil-4-(1-metilhexil)-trans ciclohexano	5.558
7	15.877	C ₁₅ H ₂₄	1-(1,5-dimetilhexil)-4-metilbenceno	3.396
8	16.501	C ₁₅ H ₃₂	Trimetilo de 2,6,10-dodecano; Farnesano (isómero)	1.248
9	18.825	C ₂₀ H ₄₂	10-Metilnonadecano	
10	20.015	C ₂₀ H ₄₂	2,6,10,14 tetrametilhexadecano	9.544
11	20.265	C ₂₀ H ₄₀	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno	2.426
12	20.39	C ₂₀ H ₄₀	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno (isomero)	2.065
13	21.268	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Éster metílico de ácido-14-metil pentadecanoico	12.471
14	21.688	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido hexadecanoico / Ácido Palmítico	1.950
15	24.488	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	Éster metílico de ácido esteárico, metil estearato	16.857
16	28.938	C ₂₆ H ₅₄	Hexacosano	1.160
17	30.882	C ₂₇ H ₄₈	Colestano	0.178
18	31.483	C ₂₈ H ₄₈	5- α -ergost-8(14)eno	0.449
19	32.095	C ₂₈ H ₄₆ O	Ergosta-5,22-dien-3-ol	1.069



Cromatograma de los productos de reacción. A)Tiempo de retención 4-19 min. B) Tiempo de retención 19-33 min