

Capítulo 7 Perfil lipídico en una cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta* y su potencial para producción de biodiesel

Chapter 7 Lipid profile in a strain of the *Dunaliella tertiolecta* microalgae and its potential for biodiesel production

MEJIAS-BRIZUELA, Nildia†*, PALOMARES-RUIZ, Irma, PANIAGUA-SOLAR, Laura y GOMEZ-CORDOBA, Fidel

*Universidad Politécnica de Sinaloa, Programa Académico de Ingeniería en Energía
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*

ID 1^{er} Autor: *Nildia, Mejias-Brizuela* / **ORC ID:** 0000-0003-2973-473X, **CVU CONACYT ID:** 253092

ID 1^{er} Coautor: *Laura, Paniagua-Solar* / **ORC ID:** 0000-0001-8961-868, **CVU CONACYT ID:** 349858

ID 2^{do} Coautor: *Irma, Palomares-Ruiz* / **ORC ID:** 0000-0002-2577-1288

ID 3^{er} Coautor: *Fidel, Gomez-Cordoba* / **ORC ID:** 0000-0002-0218-7644, **CVU CONACYT ID:** 721578

DOI: 10.35429/H.2020.8.86.103

N. Mejias, L. Paniagua, I. Palomares, F. Cordoba

nmejias@upsin.edu.mx

A. Marroquín, J. Olivares, L. Cruz y A. Bautista. (Coord) Ciencias ambientales, uso de recursos. Handbooks-©ECORFAN-Mexico, Querétaro, 2020.

Resumen

La problemática atmosférica por uso de fósiles ha motivado en la comunidad científica la generación de proyectos que aporten fundamentalmente viabilidad económica al país aparte de beneficios ambientales y sociales, por ello las fuentes energéticas renovables están jugando un papel importante. En el área de los biocombustibles puros ha sido complicado alcanzar la meta, no por la disponibilidad de la biomasa sino por la producción que se logra después de su conversión, siendo aún el balance energético no competitivo. Muchas especies de microalgas están siendo los nuevos insumos con expectativas para una posible solución para la producción de combustibles como el biodiésel. En esta investigación se estudió el crecimiento celular de una cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta* en dos medios de cultivo para determinar el perfil de ácidos grasos contentivos en los lípidos de la microalga y poder evaluar el potencial de la microalga para la producción de biodiésel. El medio de cultivo más efectivo para el crecimiento fue el de Guillard en el que se alcanzó una concentración de la microalga de 2.1×10^6 cel/mL en 21 días de cultivo. La extracción de los lípidos producidos en la pared celular de la microalga se obtuvo en 20 minutos empleando sonicación y el método de Bligh & Dyer modificado previa recuperación de la biomasa por sedimentación-floculación con hidróxido de sodio como el mejor agente (98%). El perfil lipídico se compuso de 46% de ácidos grasos saturados y 54% de ácidos grasos insaturados, adecuados para la producción de biodiésel. Sin embargo, está presente el ácido linolénico lo cual pudiera afectar la estabilidad oxidativa del diésel.

Dunaliella tertiolecta, Ácidos Grasos, Lípidos, Biodiésel, Floculación

Abstract

The atmospheric problem due to the use of fossils has motivated in the scientific community the generation of projects that fundamentally contribute to economic viability to the country and environmental and social benefits, therefore renewable energy sources are playing an important role. In the area of pure biofuels, it has been difficult to reach the goal, not because of the availability of biomass but because of the production that is achieved after its conversion, the energy balance still being non-competitive. Many species of microalgae are being the new inputs with expectations for a possible solution to produce fuels such as biodiesel. In this research, the cell growth of a strain of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* was studied in two culture media to determine the profile of fatty acids containing the lipids of the microalgae and to be able to evaluate the potential of the microalgae for the production of biodiesel. The most effective culture medium for growth was Guillard's, in which a microalgae concentration of 2.1×10^6 cells / mL was reached in 21 days of culture. The extraction of the lipids produced in the cell wall of the microalgae was obtained in 20 minutes using sonication and the modified Bligh & Dyer method after recovering the biomass by sedimentation-flocculation with sodium hydroxide as the best agent (98%). The lipid profile was composed of 46% saturated fatty acids and 54% unsaturated fatty acids, suitable to produce biodiesel. However, linolenic acid is present which could affect the oxidative stability of diesel.

Dunaliella tertiolecta, Fatty acids, Lipids, Biodiesel, Flocculation

7. Introducción

Las funciones fundamentales que permiten salvaguardar la vida de los seres vivos tales como la circulación de elementos químicos a través de los ciclos biogeoquímicos, la regulación de la temperatura y presión del planeta, la absorción y filtración de la radiación ultravioleta solar y la circulación de masas de aire frío y aire caliente suceden gracias a la atmósfera terrestre.

Esta permanencia del ser humano en la tierra y las actividades generadas por su evolución a partir de la revolución industrial han desgraciadamente forjado una serie de consecuencias, siendo una de las más graves la emisión y acumulación crónica de un gran número de sustancias químicas contaminantes a la atmósfera, debido a procesos de combustión incompleta generados tanto por fuentes fijas (industrias) como por fuentes móviles (vehículos de motor) dado el uso de recursos energéticos fósiles como el petróleo y sus derivados, el carbón y el gas natural.

De acuerdo a esto, la contaminación atmosférica es de tipo global pero también tiene carácter local, lo que provoca que la calidad del aire en zonas urbanas se afecte considerablemente y por ello se convierta de acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OCDE) en uno de los principales problemas de salud pública (INECC, 2018) por lo que es y será uno de los problemas ambientales con mayor relevancia a resolver por la humanidad en el siglo XXI, aún más si persisten los modelos energéticos actuales.

En México, a pesar de los esfuerzos para la reducción de emisiones atmosféricas contaminantes y el fomento de la sostenibilidad y sustentabilidad a través de la generación de energía por fuentes renovables, el balance nacional de energía publicado en 2019 por la Secretaría de Energía (SENER) reporta que el país ocupa el lugar 12 en importación de gasolina y diésel, lo que demuestra que cada año cuesta más alcanzar la independencia energética. En cuanto al consumo total, el sector más intensivo en el uso de la energía es el transporte seguido del industrial, residencial-comercial-público y finalmente el agropecuario, siendo el diésel el petrolífero que se consume en tres de los cuatro sectores (agropecuario, transporte e industrial, de acuerdo con orden de consumo).

El diésel, gasoil o gasóleo es un combustible líquido constituido principalmente por hidrocarburos saturados (por ello la composición química más común es $C_{12}H_{26}$ aunque puede ser de C_{10} a C_{15}) y en menor porcentaje por hidrocarburos aromáticos (SENER, 2015). Al igual que la gasolina, sufre hidrosulfuración para eliminar el contenido de azufre, pero aun la denominación más baja de diésel producida a nivel mundial (ultra bajo azufre) tiene 3.0 % de azufre o 10 ppm (equivalente a 10 miligramos de azufre/kilogramo de diésel) (Oficina de Eficiencia Energética y Energía Renovable USA, 2010) y esto es porque el azufre es un elemento presente en el petróleo desde su formación en el subsuelo.

México, produce y comercializa a través de Petróleos Mexicanos (Pemex) diésel automotriz, agrícola-marino de bajo azufre (DBA) con 500 ppm (máximo permitido de azufre en la NOM-016-CRE-2016) y se pretendía producir y comercializar a partir de julio 2019 diésel ultra bajo azufre (DUBA) de 15 ppm (NOM-016-CRE-2016) en todo el país a partir del Acuerdo A/065/2018 emitido por la Comisión Reguladora de la Energía (CRE, 2018) pero no fue posible debido a prórroga otorgada a Pemex hasta 2024 que le permite seguir comercializando DBA en todo el país y DUBA solo en las zonas metropolitanas del Valle de México, Guadalajara y Monterrey así como en la frontera norte (CRE, 2019).

El azufre como tal es un contaminante, mucho más si se encuentra combinado con el oxígeno como por ejemplo, el bióxido de azufre generado en la combustión que se da en los motores tipo diésel, por ello la estrategia mundial es lograr la reducción significativa de la contaminación del aire a partir de bajo contenido de azufre en los combustibles fósiles y a partir de allí, la disminución considerable de emisiones de los otros contaminantes (óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno, hidrocarburos no metano, partículas, etc.) y evitar no solo los daños a la salud sino también a ecosistemas terrestres y acuáticos por efectos de la acidificación del suelo y del agua.

Estas emisiones de azufre se logran disminuir al usar DUBA debido a las tecnologías de fabricación de los nuevos motores basadas en diseños más eficientes de filtros que permiten casi el control total de partículas de sulfatos y de absorbentes y hasta un 90% de control de óxidos de nitrógeno y carbono (INECC, 2019). También se recomienda usar DUBA en modelos automotrices fabricados a partir del año 2007 en adelante y en modelos anteriores siempre y cuando se realicen algunas modificaciones al motor (Oficina de Eficiencia Energética y Energía Renovable de los Estados Unidos).

La problemática de la contaminación del aire por la combustión del diésel en el sector automotriz de acuerdo a lo descrito puede resolverse con la producción de este petrolífero con contenido de azufre bastante reducido; la realidad es que para los países en desarrollo como México, esto cuesta mucho dinero debido a que las tecnologías se centran en la refinación y aun cuando el diésel es más sencillo de refinar y por tanto más económico de producir, Pemex no cuenta ni con recursos ni con infraestructura necesarios para producirlo y abastecer todo el país dado que no ha realizado la configuración necesaria de sus refinerías, optando por la construcción de algunas de estas, tampoco tiene capacidad para almacenarlo y transportarlo por ducto (Ramírez, 2019), le es menos rentable económicamente la refinación que la exploración y producción (Instituto Mexicano para la Competitividad, 2015) por ello el DUBA 15 ppm que se consume se suple con un 77% de importación (CRE, 2019) lo que ha traído problemas porque tampoco tiene una alta capacidad de servicios portuarios que de forma simultánea le permita recibir DUBA y desalojar DBA hacia los puertos para exportación.

Los retos ambientales actuales y a futuro con los que se ha comprometido el país ante instituciones como la Organización de las Naciones Unidas para alcanzar bajos niveles de contaminantes atmosféricos están impulsando en la comunidad científica la generación de proyectos que garanticen fundamentalmente viabilidad económica al país para su implementación y desarrollo tecnológico, siendo los recursos naturales renovables los que ofrecen un panorama importante para ello gracias a que se cuenta con un amplio potencial de radiación solar, de viento, de biomasa, de recurso geotérmico entre otros.

En el área de la bioenergía, México plantea la obtención de combustibles puros de biomasa como el biodiésel (conocido también como éster metílico de ácido graso, FAME por sus siglas en inglés) con lineamientos establecidos en el complemento a la Ley para la Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, por lo que existen muchos proyectos de laboratorio y pilotos, siendo complicado alcanzar la meta, no por la disponibilidad de la biomasa natural o residual sino por la producción que se logra a partir del proceso de conversión que se le aplique a la biomasa lo que hace que el balance masa-energía aun sea no competitivo frente a los combustibles fósiles.

En tal sentido, a partir de experiencias en laboratorios y pilotos muchas especies de microalgas como las del género *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Dunaliella*, entre otras se han convertido en las nuevas materias primas para la investigación en producción de biodiésel dadas las características que poseen en comparación con los cultivos energéticos y las grasas residuales animales tales como no depender de una estación del año para su producción, producción de biomasa en tiempo relativamente corto y la fracción lipídica contentiva en la pared celular que permiten un perfil de ácidos grasos del tipo monoinsaturados y poliinsaturados transesterificables para lograr así un combustible diésel con parámetros fisicoquímicos de alto impacto en un motor tales como la estabilidad oxidativa, punto de niebla, número de cetano, viscosidad (Moreira, 2015) y a partir de allí, entonces generar los proyectos pilotos para instalaciones a futuro que puedan establecerse en México a partir de microalgas. Sin embargo y no necesariamente el biodiésel debe ser usado en un motor diésel de forma pura, en muchos países se usa como un complemento al diésel fósil, esto porque al mezclar el biodiesel mejora algunas propiedades del diésel fósil, ya que juntos pueden brindar una mayor autonomía automotriz, además el biodiésel puede obtenerse mediante reacción química rápida y sencilla como la transesterificación que emplea compuestos químicos económicamente accesibles como el metanol e hidróxido de sodio como catalizador. Además, como se muestra en la Tabla 7.1 posee una serie de características físicas y químicas que lo hacen competitivo frente al diésel fósil tales como menor contenido de azufre, la nula presencia de compuestos aromáticos, mayor índice de cetano, alta biodegradabilidad, etc.

Tabla 7.1 Propiedades químicas y físicas del diésel derivado del petróleo y el biodiésel

Propiedad	Diésel	Biodiésel
Fórmula	C10-C15 HC	C12-C22
Composición (% peso)	C 85-88 % H 12-15 %	C 77% H 12 % O 11 %
Azufre (% peso)	< 0.05	< 0.002
Aromáticos (% peso)	30	0
Agua (ppm)	161	500 máx.
Poder calorífico inferior (MJ/l)	36,6	32,6
Viscosidad cinemática 40°C, cSt	1.3-4.1	1.9-6.0
Gravedad específica 15°C (Kg/l)	0.88	0.85
Punto de ebullición (°C)	188-343	182-338
Punto de inflamación (°C)	60-80	100-170
Punto de niebla (°C)	-15/5	-3/12
Punto de vertido (°C)	-35/-15	-15/10
Índice de cetano	40-55	48-65
Relación estequiométrica (aire/combustible en peso)	15	13.8

Fuente de consulta: Pinzi et al, 2009

En este trabajo se muestra el perfil de los ácidos grasos de una cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta* y a partir de allí se describe su potencial energético para la producción de biodiésel en la región de Mazatlán, Sinaloa, México, ya que dicha microalga presenta características como adaptación de crecimiento en ambientes salinos, dulces o salobres y alta adaptabilidad a temperaturas extremas que son características comunes en la región, además la mayoría de la literatura refiere su uso para el área de la biotecnología y pocos han realizado investigaciones para producción de biodiésel. Además, se tiene el propósito de establecer proyectos piloto bajo las condiciones ambientales de la región (sistema outdoor) aprovechando el recurso solar con el que se cuenta y el calor interno de la tierra (geotermia) para sistemas de acondicionamiento de aire para su crecimiento.

El capítulo se estructura en una sección metodológica que describe los ensayos realizados para el crecimiento celular de la microalga, la extracción de la biomasa, la extracción de lípidos y ácidos grasos. Continúa la sección de resultados y discusión, conclusiones, recomendaciones y referencias bibliográficas que soportan la investigación presentada.

7.1 Metodología experimental

La investigación está basada en el método indirecto para obtención de biodiésel bajo condiciones de laboratorio (Sánchez-Bayo 2019) que consiste primero en el crecimiento de la microalga para la producción de la biomasa empleando en nuestro caso dos medios de cultivo enriquecidos con nutrientes y luego en la recuperación de la biomasa, que en el caso particular se emplearon tres agentes químicos floculantes. Esto porque el crecimiento celular de la microalga, la producción de biomasa y su recuperación son los ejes fundamentales para la obtención de los lípidos y ácidos grasos que genera la microalga y a partir de allí evaluar su potencial para obtención de biodiésel. Finalmente, después de los ensayos experimentales realizados, se aplicó la metodología de enfoque escalonado para determinar el proceso experimental (los dos medios de cultivo y los tres agentes floculantes) con el mejor rendimiento en función del tiempo empleado y a partir de allí evaluar la factibilidad para escalar la investigación a nivel piloto.

Todos los ensayos experimentales descritos se realizaron por triplicado. Todos los resultados fueron procesados mediante estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar).

7.2 Microalga de trabajo

Para llevar a cabo los ensayos se empleó un inóculo tomado de una cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta* proporcionada por el Laboratorio de Alimento Vivo del Acuario Mazatlán, Sinaloa, México.

7.3 Medios de cultivo (nutrientes)

Los medios de cultivo para el crecimiento de la microalga fueron el medio de Guillard (F/2) y el medio de Erdschreiber preparados de forma artificial en una disolución concentrada de cloruro de sodio (agua salada) a la que se añadió macronutrientes y elementos trazas (conocidos también como micronutrientes). La diferencia entre ambos medios radica en que el medio de Guillard contiene silicato aparte de los macronutrientes comunes (nitrógeno y fósforo) y también micronutrientes orgánicos como las vitaminas (cianocobalamina o B12, biotina o H y tiamina HCl o B1) (Canadian Phycological Culture Centre y University of Texas).

La preparación del medio de cultivo de Guillard consistió primero en preparar 1.0 L de las soluciones stock o soluciones madres de los macronutrientes, de los metales trazas y de las vitaminas (solo B12 y H) en agua destilada (dH₂O) descrita en la columna cuatro de la Tabla 7.2. Luego se preparó una solución compuesta por la mezcla de los metales trazas para lo cual a 950 mL de dH₂O se le agregó la cantidad indicada en la columna cinco de la Tabla 7.2 de cada una las soluciones stock de estos metales y se aforo a un volumen de 1.0 L, de igual manera se preparó la solución de las dos vitaminas. Finalmente, el medio de cultivo se preparó agregando a un volumen inicial de 950 mL de agua salada 1.0 mL de cada una de las soluciones de los macronutrientes, 1.0 mL de la solución compuesta por la mezcla de los metales trazas y 1.0 mL de la solución de vitaminas con ajuste del pH a 8.0 y aforando a un volumen de 1.0 L. El medio de cultivo de Erdschreiber se preparó bajo la misma metodología descrita para medio de Guillard agregando las cantidades indicadas en la Tabla 7.2.

Todas las soluciones fueron esterilizadas en autoclave y tanto las soluciones madres como el medio de cultivo fueron envueltas en Parafilm y congeladas para evitar su desnaturalización y su uso en el tiempo.

Tabla 7.2 Composición de los medios usados para los cultivos de *Dunaliella tertiolecta*

N°	Soluciones stock	Medio de cultivo	Solución stock (g/L)	Cantidad agregada para 1.0 L de solución substock	Volumen agregado al medio de cultivo (mL)
1	Agua salada	Guillard-Erdschreiber	34.0	-----	1000
Macronutrientes				-----	
2	NaNO ₃	Guillard	75.0	-----	1.0
		Erdschreiber	59.5	-----	3.3
3	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	Guillard	5.0	-----	1.0
	Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	Erdschreiber	5.4	-----	3.3
4	Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	Guillard	30.0	-----	1.0
Metales trazas		Guillard			1.0
		Erdschreiber			12.0
5	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	Guillard	-----	4.36 g	
		Erdschreiber	0.750	2.0 mL	
6	FeCl ₃ •6H ₂ O	Guillard	-----	3.15 g	
		Erdschreiber	0.097	2.0 mL	
7	MnCl ₂ •4H ₂ O	Guillard	180.0	1.0 mL	
		Erdschreiber	0.041	2.0 mL	
8	ZnSO ₄ •7H ₂ O	Guillard	22.0	1.0 mL	
	ZnCl ₂	Erdschreiber	0.005	2.0 mL	
9	CoCl ₂ •6H ₂ O	Guillard	10.0	1.0 mL	
		Erdschreiber	0.002	2.0 mL	
10	CUSO ₄ •5H ₂ O	Guillard	9.8	1.0 mL	
11	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	Guillard	6.3	1.0 mL	
		Erdschreiber	0.004	2.0 mL	
Vitaminas		Guillard			1.0
		Erdschreiber			1.0
12	B ₁₂	Guillard-Erdschreiber	1.0	1.0 mL	
13	H	Guillard	1.0	1.0 mL	
14	B ₁	Guillard	-----	200 mg	

Fuente de consulta: Elaboración propia con datos tomados de Canadian Phycological Culture Centre y University of Texas

7.4 Parámetros fisicoquímicos para crecimiento microalgal

El crecimiento celular de la cepa de microalga en los medios de cultivo descritos se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioenergía de la UPSIN México, en un espacio físico de 1.80 m² en el que se dispuso una estructura metálica de 4 compartimientos (Figura 7.1) con la adaptación de los parámetros descritos en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3 Parámetros para el crecimiento celular de la microalga *Dunaliella tertiolecta*

Luz	Intensidad lumínica de 6,000-7,000 lux suministrada por lámparas fluorescentes (30 W) dispuestas permanentemente durante 24 h frente a los fotorreactores
Temperatura	23±1 °C
Fuente de carbono	CO ₂ atmosférico suministrado por una bomba de aireación que permitió también agitación continua
pH	7.8

Fuente de consulta: Elaboración propia

7.5 Propagación microalgal

La propagación de la microalga *Dunaliella tertiolecta* se realizó mediante un sistema de cultivo tipo batch alimentado, es decir, una vez iniciado el crecimiento celular se realizaron diluciones a través de una transferencia volumétrica del medio de nutrientes preparado con la intención de conservar las cepas en fase de crecimiento y alcanzar alta concentración de biomasa (Coutteau, 2013).

Bajo las condiciones descritas en la Tabla 7.3, los cultivos iniciaron en tubos de ensayo con 30 mL del medio de nutriente (medio de Guillard o medio de Erdschreiber), cuando se alcanzó una densidad celular promedio de 1.5×10^6 Cel/mL se escaló a un volumen de 120 mL (lo que implicó agregar 90 mL del medio de nutrientes a la muestra inicial de 30 mL). Así sucesivamente se realizó la transferencia volumétrica del medio de cultivo a las muestras microalgales hasta alcanzar un volumen final de trabajo de 16 L. El acoplamiento al sistema de aireación constante se introdujo alcanzados los 800 mL de cultivo microalgal.

Los fotorreactores utilizados fueron inicialmente matraces Erlenmeyer (125, 500, 1000, 3000 mL), luego contenedores cilíndricos estériles de vidrio transparente de 4 L y finalmente contenedores cilíndricos estériles de plástico azul de 19 L. En todas las diluciones realizadas se hizo ajuste de pH. La Figura 7.1 muestra la estructura metálica donde se llevó a cabo el cultivo microalgal empleando los dos medios de cultivos enriquecidos con los nutrientes descritos.

La transferencia volumétrica del medio de cultivo se calculó mediante la ecuación 1 (Arana, Orruño, Barcina, 2012) en la que V_i representa el volumen de inóculo que se necesita para el próximo cultivo, V_f el volumen final que se tendrá al hacer la dilución y NC_i , NC_f representan el número de células presentes en el inóculo y las que finalmente se desean tener en el cultivo después de la dilución.

$$V_i = \frac{NC_f V_f}{NC_i} \quad (1)$$

Figura 7.1 Fotorreactores utilizados para crecimiento de una cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta*



Fuente de consulta: Elaboración propia

7.6 Evaluación de la propagación microalgal

La propagación de la microalga en los medios de cultivo descritos se evaluó a partir de las cinéticas de crecimiento celular que se construyeron realizando por triplicado un recuento celular cada 24 horas de las muestras microalgales que se tenían, tomando para ello 1.0 mL de esa muestra que se fijó con 50 μ L de solución Lugol al 10 % que se colocó sobre una cámara de conteo de Neubauer (hemocitómetro) de doble línea brillante 0,1 mm de profundidad y para su observación se empleó microscopía óptica a 10 X y 40 X.

Para cuantificar la eficiencia de la propagación microalgal se determinó la tasa específica de crecimiento (μ) donde X_i representa la concentración inicial de la biomasa y X_f la respectiva concentración final de la biomasa respecto al tiempo y a partir de allí se determinó el tiempo de duplicación promedio (t_d) de crecimiento de la microalga (Godoy-Hernández, Vázquez-Flota, 2006).

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t}; \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

7.7 Extracción de biomasa

La producción de la biomasa se logra a partir de la propagación de la microalga en los medios de cultivo enriquecidos, debe estar lo más deshidratada que se pueda para poder llevar a cabo los ensayos experimentales siguientes y posteriormente la producción de los biocombustibles como el biodiésel. Sin embargo, su concentración se ve afectada por efectos de la dilución sucesiva que se realice, lo que hace que la extracción de la biomasa de microalga en muchas ocasiones también se dificulte.

Los métodos de extracción mecánicos, químicos o biológicos y sus combinaciones, siguen siendo a la fecha los más reportados en la literatura ya que brindan porcentajes óptimos de biomasa en laboratorio y de biomasa de valor comercial, sabiendo que depende mucho de la cepa de microalga que se estudie.

En este trabajo al término del periodo de crecimiento celular de *Dunaliella tertiolecta* en los dos medios de cultivo descritos, la recuperación de la biomasa dispersa en todo el volumen de trabajo se realizó mediante sedimentación-floculación seguido de centrifugación y liofilización.

El proceso de sedimentación-floculación se realizó como se mencionó en el apartado de metodología experimental, comparando tres agentes floculantes (básico, ácido y salino) agregados bajo concentración química fija (1.0 mol/L), variación de pH de la biomasa microalgal ($4.0 < \text{pH} < 11.0$) y tiempo fijo de reposo (24 h) con la intención de promover la auto floculación de la biomasa (conocido como test de jarra). Se empleó una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) para incrementar el pH inicial de la biomasa húmeda microalgal de 7.8 a valores entre 10.0-11.0 (Ummalyma, Mathew, Pandey, Sukumaran, 2016), una disolución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) para disminuir el pH inicial de la biomasa húmeda microalgal de 7.8 a valores de pH entre 4.0-5.0 (Liu y colaboradores, 2014) y por último, una disolución de sulfato de aluminio [Al₂(SO₄)₃] en cuyo caso no funcionó la concentración química establecida y se decidió un barrido con disoluciones de 0.25, 0.50 y 0.75 mol/L bajo el mismo tiempo de reposo (Andía-Cárdenas, 2000).

Para estimar la eficiencia de floculación mediante la ecuación 3 (Harith y colaboradores, 2009) se determinó antes y después de la agregación del agente floculante la densidad celular representadas por D_i y D_f respectivamente en la ecuación.

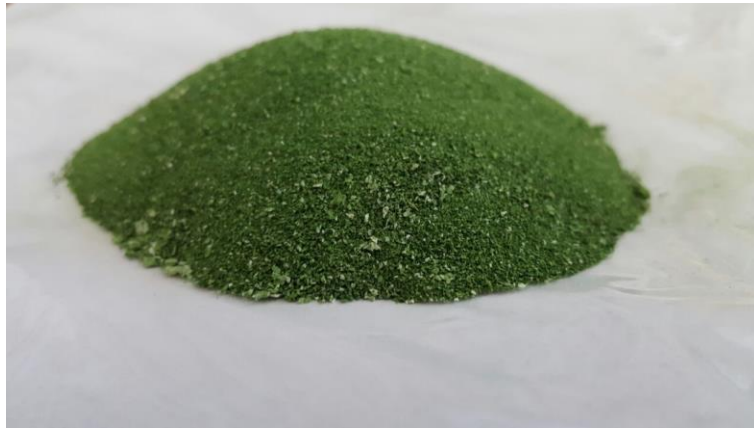
$$E_{floc} = \left[\frac{D_i - D_f}{D_i} \right] \times 100 \quad (3)$$

La centrifugación se llevó a cabo con el fin de obtener la mayor separación de biomasa microalgal del medio acuoso en el que se encontraba. Se emplearon tubos de centrifugación de 50 mL de capacidad, utilizando un campo centrifugo a 5000 rpm de velocidad y 5 min de centrifugación (Chen y colaboradores, 2011). La biomasa obtenida se resguardó en un congelador a -20°C.

Consecutivamente, se realizó la liofilización para lograr la mayor deshidratación de la biomasa centrifugada, para ello se utilizó un liofilizador conectado a una bomba de vacío cuya primera etapa (deseccación primaria) se llevó a cabo a -50 °C de temperatura y 53 KPa (Kilopascal) de presión, para posteriormente someter la muestra a la segunda etapa de secado con una temperatura de 39 °C y 39 KPa (SP industries, 2009). Finalizado el proceso, la biomasa seca reposó por espacio de 1 h bajo condiciones ambientales de laboratorio (± 25 °C), se pesó y se resguardó en el congelador en bolsas estériles identificadas (cepa de microalga, peso y día de obtención de biomasa).

Al término de los métodos realizados, la biomasa microalgal obtenida quedó en forma de sólido pulverulento, color verde y olor característico marino, tal como se muestra en la Figura 7.2.

Figura 7.2 Biomasa seca de una cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta*



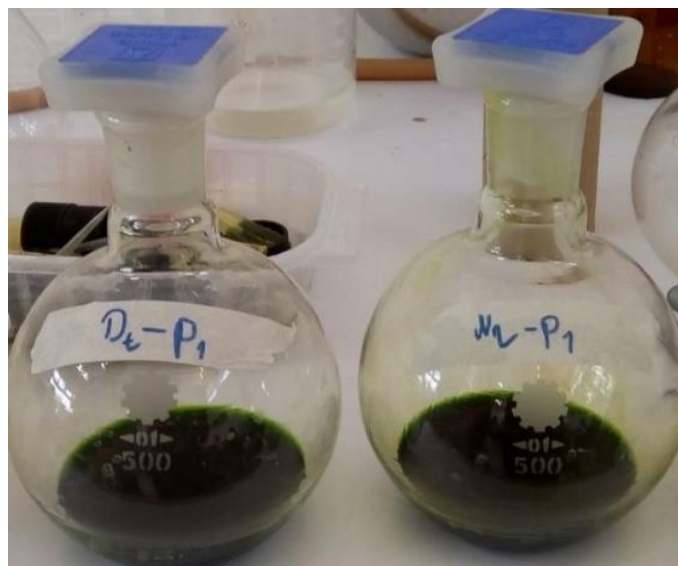
Fuente de consulta: Elaboración propia

7.8 Extracción y caracterización de lípidos

Para la extracción de los lípidos presentes en la biomasa seca obtenida de la microalga *Dunaliella tertiolecta* se realizó la disrupción celular empleando extracción con ultrasonido (sonicación) debido a que es uno de los métodos físicos eficientes porque emplea menor tiempo de extracción, con muy buen rendimiento de extracción y menos residuos si se compara con los métodos químicos de extracción por solventes mediante soxhlet (Suarsini, 2011; King, 2014).

Para llevar a cabo la sonicación se empleó el método modificado de Bligh & Dyer que consistió como primer paso en la homogeneización de toda la biomasa seca en una mezcla cloroformo-metanol y agua (Archanaa, Moise, Suraishkumar, 2012). Luego se tomaron 20 g de esta muestra y se les agregó una mezcla cloroformo-metanol (2:1) se agitó durante 15 min y 200 rpm (Soto y colaboradores, 2014). Seguido, la muestra fue colocada en un baño ultrasónico a una frecuencia fija de 40 KHz (Kilo Hertz) durante 20 min, finalizando el proceso con la adición de cloroformo-metanol-agua (2:2:1.8) a 5000 rpm por 5 min (El Arroussi, Benhima, Bennis, El Mernissi, Wahby, 2015) con el objetivo de mejorar la formación de las dos fases (superior: metanol-agua e inferior: biomasa-lípidos-cloroformo). La recuperación de los lípidos se hizo mediante decantación de las fases removiendo los solventes por evaporación al vacío a 60 rpm y 10 min. La Figura 7.3 muestra el producto final obtenido. Las muestras fueron resguardadas en frascos ámbar refrigerados a 5 °C para posterior caracterización del perfil de ácidos grasos.

Figura 7.3 Lípidos extraídos con ultrasonido en una cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta*



Fuente de consulta: Elaboración propia

El contenido porcentual de lípidos extraídos se determinó a partir de la ecuación 4, la cual toma en cuenta la cantidad de biomasa microalgal antes de ser sometida a la extracción (B_i) y la cantidad de biomasa microalgal después de la extracción (B_f) (Shuping y colaboradores, 2010).

$$L (\%) = \frac{B_f}{B_i} \times 100 \quad (4)$$

La producción volumétrica lipídica por día (P_v) también se determinó ya que es directamente proporcional a la concentración de la biomasa (C_B) y al contenido de lípidos extraídos (L) de acuerdo con la ecuación 5 (Talebi y colaboradores, 2013).

$$P_v = C_B \times L \quad (5)$$

La caracterización del perfil de los ácidos grasos contentivos en los lípidos de la microalga se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Culiacán, Sinaloa, México inyectando 1.0 mL de muestra a un cromatógrafo de gases acoplado a una columna Agilent DB-5ms con temperatura programada entre 50-180 C, 300 °C para el inyector y 320 C para el detector FID. Dicho perfil se caracterizó solo en la biomasa microalgal cultivada en el medio de nutrientes de Guillard.

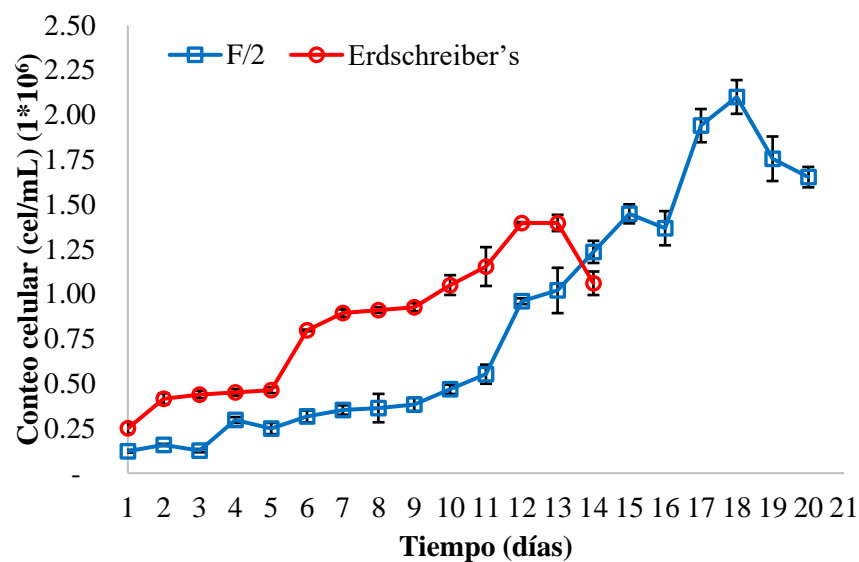
Los metil esteres de los ácidos grasos se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención con estándar de ácidos grasos (37 FAME compounds, Supelco™ Mix C4- C24; trophic markers). La cuantificación se realizó mediante la integración del área bajo la curva en los trazos cromatográficos utilizando el software CHROMQUEST 4.1 con calibraciones derivadas de los ácidos grasos estándar.

7.9 Resultados

7.10 Evaluación de la propagación microalgal: Cinética de crecimiento celular

El crecimiento celular de la cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta* a través de su propagación en los dos medios de cultivo (Guillard y Erdschreiber) y los conteos diarios se presenta en el Grafico 7.1. La cinética de crecimiento celular muestra que para el medio de cultivo de Guillard (F/2) se alcanzó una densidad celular máxima de $2.10 \pm 0.12 \times 10^6$ cel/mL en el día 18, mientras que, para el medio de cultivo Erdschreiber se alcanzó en el día 12 con un número total de $1.40 \pm 0.05 \times 10^6$ cel/mL.

Gráfico 7.1 Cinética de crecimiento celular de una cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta* en los medios de cultivo de Guillard y de Erdschreiber



Fuente: Elaboración propia

El comportamiento de la microalga muestra que el medio de nutrientes de Erdschreiber permitió mayor número de células por cada mililitro de cultivo los primeros 12 días, pero a partir de ese tiempo decae frente al medio de nutrientes F/2.

En cuanto a la densidad celular máxima obtenida en el medio de cultivo F/2 (2.10×10^6 cel/mL) se observa una tendencia similar a los resultados obtenidos por Neto y colaboradores en 2012 que lograron en 18 días la máxima densidad celular de *Dunaliella tertiolecta*. La densidad celular obtenida es más alta que la obtenida por López-Elías y colaboradores en 2013, que obtuvieron 1.28×10^6 cel/mL en 09 días de crecimiento en laboratorio y es menor que la obtenida por Calderón y Serpa en 2003, que en un máximo de 11 días de crecimiento en condiciones de laboratorio reportaron una densidad celular de 3.0×10^6 cel/mL.

Para el medio de cultivo Erdschreiber, solo se pudo realizar comparativa con los resultados obtenidos por Tang y colaboradores en 2011, que reportaron 1.2×10^7 cel/mL como densidad celular máxima para *Dunaliella tertiolecta*, mayor a la obtenida en este trabajo. Existen reportes relacionados con el medio de nutrientes, pero en otras especies de microalgas como *Dunaliella salina*, por ejemplo, Mishra, Mandoly y Jha en 2008 reportaron una densidad celular máxima de 5.0×10^5 cel/mL.

La Tabla 7.4 resume los resultados obtenidos en cuanto a la tasa específica de crecimiento celular (μ) y el tiempo de duplicación (td) para la cepa de *Dunaliella tertiolecta* que se obtuvieron a partir de la ecuación matemática (2).

Tabla 7.4 Eficiencia del crecimiento celular de *Dunaliella tertiolecta* empleando dos medios de cultivo

Parámetro determinado	Medio de cultivo Guillard	Medio de cultivo Erdschreiber
μ (d ⁻¹)	0.21 ± 0.02	0.15 ± 0.01
td (d)	3.34 ± 0.29	4.60 ± 0.33

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con ello, la mayor μ y el menor td (lo ideal en cultivos de microalgas con fines energéticos) se obtuvo con el medio de cultivo de Guillard lo que podría implicar que es más eficiente que el medio de cultivo Erdschreiber. Para corroborarlo se realizó un análisis de varianza ANOVA de factor 1 basado en la densidad celular, que con un nivel de confianza de 95% confirmó que no hubo relación en el crecimiento celular de la microalga empleando los medios de cultivo seleccionados y permitió confirmar que efectivamente el medio de cultivo F/2 es más eficiente, adaptable y el recomendado para proseguir los trabajos de investigación donde la prevalencia sea mayor densidad celular para mayor concentración de biomasa en el menor tiempo de duplicación de células de la microalga. Baldiris y colaboradores en 2017 también realizaron un análisis de varianza para determinar la eficiencia de crecimiento de dos microalgas diferentes en un mismo medio de cultivo enriquecido con nutrientes y concluyeron que una de ellas creció de forma más efectiva en el medio de cultivo que la otra microalga, lo que se corroboraba a través de μ y td con los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento por conteo diario realizado.

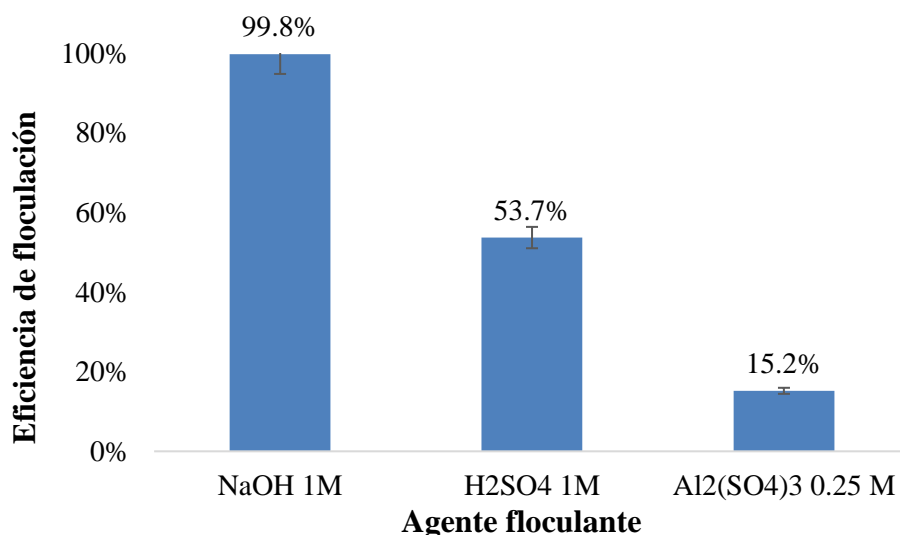
La concentración de los nutrientes en un medio líquido salobre o no es un parámetro que influye considerablemente en la producción de biomasa, principalmente los nutrientes inorgánicos nitrogenados fundamentales para el crecimiento y mantenimiento celular, los fosforados porque limitan significativamente el crecimiento de las microalgas y los silicatos porque contribuyen a funciones de la estructura celular de algunas microalgas por lo que el agregarlos depende de que la especie de microalga a trabajar lo requiera, otros como los micronutrientes orgánicos como las vitaminas también contribuyen ampliamente al crecimiento microalga y producción de lípidos, aun cuando su ausencia no limita el crecimiento de las microalgas.

Por ello, lo que pudo marcar la diferencia de crecimiento de la microalga de trabajo en el medio de cultivo de Guillard respecto al medio de cultivo de Erdschreiber es que, en el primero aun cuando las cantidades agregadas de los nutrientes inorgánicos (macronutrientes) es menor que las agregadas en el segundo medio de cultivo, la concentración de las soluciones stock es mayor para el medio de Guillard lo que permite que sea un medio más enriquecido en nutrientes, además posee silicatos en muy buena proporción lo que contribuye a funciones estructurales de la célula y las tres vitaminas donde la biotina y la tiamina contribuyen mucho a la biosíntesis de los lípidos que se requieren, por lo tanto, el medio Erdschreiber es un medio enriquecido pero más diluido respecto a los nutrientes, es decir deficiente, lo que impacta desfavorablemente en el crecimiento de la microalga, como lo expone López-Elías y colaboradores en 2013 al realizar investigación con *Dunaliella tertiolecta* en medio F/2 con y sin limitación de nitrógeno.

7.11 Extracción de biomasa

La recuperación o extracción de la biomasa se hizo por adición de agentes químicos floclulantes a la suspensión de microalgas provocando cambios en el pH a dicha suspensión, siendo el hidróxido de sodio el agente químico de mayor eficiencia porcentual (99.8 ± 0.3 %) en un tiempo de 24 h, seguido del ácido sulfúrico (53.7 ± 1.2 %) y el de menor eficiencia para la formación de flóculos algales en el mismo tiempo de 24 h, fue el sulfato de aluminio (15.2 ± 3.2 %) pero a concentración molar menor, tal como se representa en el Gráfico 7.2.

Gráfico 7.2 Eficiencia de la floclulación para la obtención de la biomasa de la microalga *Dunaliella tertiolecta*



Fuente: Elaboración propia

Lo correcto es: la bibliografía consultada sobre recuperación de biomasa de la microalga *Dunaliella tertiolecta* no establece fines biológicos ni energéticos, esto porque depende del propósito que se persiga en la investigación, por la posibilidad de contaminar la biomasa y por posibles modificaciones en las características de la biomasa, por ello se reportan métodos gravimétricos y otros reportan métodos físicos como filtración y secado. Sin embargo, hay reportes respecto al uso de la floclulación con los agentes químicos empleados en este trabajo en otros géneros y especies de microalgas como *Nannochloropsis sp.* que tiene similitud con el género *Dunadiella*. En este sentido, Rojo-Cebreros y colaboradores en 2016 recuperaron la biomasa de una cepa de *Nannochloropsis sp* para fines acuícolas empleando NaOH 0,5 eq/L (0,5 mol/L) alcanzando una eficiencia de floclulación de 94,9 % a pH básico y en menos de 1 h. En otra investigación, Unmalyma en 2016 determinó que el NAOH en un tiempo de 10 min fue el agente químico de mayor floclulación (94%) con cambios en el pH de *Chlorococcum sp* en comparación con el Al₂SO₄ que fue de 87%.

Como se aprecia en el Grafico 7.2 el agregar un agente floculante básico-fuerte como el NaOH no afectara la extracción de los lípidos en la microalga *Dunaliella tertiolecta* ya que la recuperación de la biomasa fue excelente en contraste con la adición del agente floculante ácido que resulto en una reducción de recolección de biomasa de más de 40% y mucho más la sal agregada que presento una nula recuperación a la misma concentración de los dos floculantes anteriores. Esto indica que el hidróxido de sodio es más efectivo en generar flóculos en tiempos de sedimentación cortos debido a que logra rápidamente el rompimiento de las fuerzas de atracción de Van der Waals y las fuerzas de repulsión electrostática que existen en la pared celular, mientras que el sulfato de aluminio puede adherirse a las células de la microalga y sedimentarse con los flóculos que se forman provocando una mayor afinidad electrostática intermolecular.

7.12 Extracción de lípidos y perfil de ácidos grasos

La extracción de lípidos intracelular asistida por sonicación y método Bligh & Dyer arrojó un porcentaje de 33.5 ± 1.1 % una vez alcanzada la disrupción de la pared celular en 20 min y 40Hz de potencia y la cantidad de biomasa generada por unidad de volumen de cultivo fue de 7.813 mg/Ld. En 2012, Nowotarski y colaboradores usaron solo sonicación para la disrupción celular de *Dunaliella salina* lograda en un tiempo de 16 min, similar a lo obtenido en este trabajo. En el caso del método de Bligh & Dyer, Araujo y colaboradores en 2013 determinaron de seis métodos ensayados que sonicación con Bligh & Dyer es el de mayor eficiencia (52,5 %) para la extracción de lípidos en *Chlorella vulgaris*.

La cromatografía de gases realizada arrojo nueve ácidos grasos distribuidos en: cinco ácidos grasos saturados constituidos por cadenas carbonadas de C12 a C18 y cuatro ácidos grasos insaturados conformados por dos monoinsaturados (C17:1, C18:1) y dos poliinsaturados (C18:2, C18:3) como se muestra en la Tabla 7.5, en la cual están ordenados en función de su concentración porcentual decreciente y su nomenclatura abreviada.

Tabla 7.5 Perfil de ácidos grasos presente en la cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta*

Ácido graso	Nomenclatura	% presente
SATURADOS		
Hexadecanoico (Palmítico)	C16:0	21.2 ± 0.3
Octadecanoico (Esteárico)	C18:0	11.2 ± 0.1
Heptadecanoico	C17:0	8.9 ± 1.7
Pentadecanoico	C15:0	2.9 ± 0.9
Dodecanoico (Láurico)	C12:0	1.6 ± 0.2
Total:	45.8 ± 0.6	
INSATURADOS		
9,12,15-octadecatrienoico (Linolénico)	C18:3 ^{9,12,15}	37.2 ± 1.1
9,12-octadecadienoico (Linoleico)	C18:2 ^{9,12}	8.0 ± 0.1
9-octadecenoico (Oleico)	C18:1 ⁹	6.6 ± 0.1
Cis-10-Heptadecenoico	C17:1	2.4 ± 0.0
Total:	54.2 ± 0.3	

Fuente: Elaboración propia

Se aprecia que, hay una mayor composición porcentual de ácidos grasos insaturados siendo el ácido linolénico el de mayor contribución, mientras que en los ácidos grasos saturados lo es el ácido palmítico, lo cual es similar al perfil de ácidos grasos reportado por Hoekman y colaboradores en 2012 y Tang y colaboradores en 2011 para la misma microalga cultivada en medio de nutrientes de Guillard pero con condiciones de laboratorio diferentes a las realizadas en este trabajo y con fines biotecnológicos.

Es nula la información que existe acerca de la producción de biodiesel a partir de *Dunaliella tertiolecta* y de otras especies de microalgas que pueden ser de interés para tal fin, solo se hacen inferencias de la influencia de los ácidos grasos obtenidos sobre las propiedades fundamentales de dicho combustible tal como la estabilidad oxidativa.

Bajo esa temática, el perfil de ácidos grasos de *Dunaliella tertiolecta* obtenido con las condiciones de crecimiento y extracción de biomasa y lípidos establecidas en este trabajo puede considerarse con potencial para la producción de biodiesel ya que contiene los principales ácidos grasos utilizados como insumos: palmítico, esteárico como parte de los saturados, oleico, linoleico como insaturados, los cuales no cambiarán una vez obtenido el biodiesel por transesterificación química, pero si influirán en propiedades específicas del combustible como la estabilidad oxidativa, punto de niebla, número de cetano, viscosidad y calor de combustión y por consecuencia en el desempeño en un motor diésel (Moreira, 2012).

Tejada y colaboradores en 2015 analizaron la influencia del perfil lipídico de la microalga *Dunaliella salina* y *Chlorella sp.* sobre propiedades del biodiesel, donde el ácido linolénico es el de mayor porcentaje y concluyeron que la estabilidad oxidativa se afectaría principalmente cuando el combustible se almacene por tiempo prolongado, lo cual se corrige agregando compuestos antioxidante sintéticos o resguardarlo en ambientes con poca luz y corrientes de aire. También indican que un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados favorece la operatividad del biodiésel como combustible a bajas temperaturas ya que este tipo de ácidos grasos presentan menor punto de fusión lo que brinda mayor fluidez del biodiésel en el motor.

Es aceptable efectuar comparativa del perfil de ácidos grasos obtenido de microalgas con perfil de ácidos grasos obtenidos a partir de aceites vegetales puros y/o grasas animales, porque finalmente la estructura química de los ácidos grasos se mantiene. Moreira en 2012 reporta que el biodiésel a partir del aceite vegetal de soja el cual tiene contenido significativo de ácido linolénico cumple con el valor mínimo de estabilidad oxidativa (3 h) establecido en la norma de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM por sus siglas en inglés) por las cuales también se rige México en los lineamientos para la obtención de etanol anhidro, biodiésel y bioturbosina puros a partir de 2018. El biodiésel obtenido presenta propiedades excelentes de baja temperatura como punto de niebla.

Otro parámetro importante que por consecuencia de la estabilidad oxidativa se afecta, es el número de cetano (C₁₆H₃₄), que se evalúa mediante dos valores, el de alto estándar de calidad (no ramificado, con valor máximo de número de cetano (NC) de 100, 47 como valor mínimo) y el de baja calidad de ignición (ramificado, NC 15) de acuerdo con normas ASTM. Moreira reporta que el biodiesel de aceite de soja presenta un NC por encima del valor mínimo establecido (51). Tejada en 2013 analizó el perfil lipídico del biodiesel a partir de residuos grasos de pollo que presentó mayor concentración de ácidos grasos insaturados describiendo lo mismo, baja estabilidad oxidativa pero buena fluidez a baja temperatura.

Aun cuando se describe que el perfil lipídico de una microalga del mismo género o de otro, de un cultivo vegetal o de una grasa animal pueden coincidir, es también cierto que en las microalgas, éste siempre será afectado por las condiciones nutrimentales (como el déficit de nitrógeno y/o fosforo), condiciones de cultivo (como estrés salino) y ambientales (temperatura, pH) por ello, Arias y colaboradores en 2013 propusieron que para garantizar los parámetros fundamentales exigidos para biodiésel de calidad o puro, lo más conveniente sería una mezcla de aceites producidos por diferentes géneros de microalgas ya que el objetivo de la bioenergía es poder desarrollar un proceso viable y factible en lo económico y energético que pueda ser competitivo con los combustibles fósiles.

Pinzi y colabores en 2009 concluyeron que la composición óptima para biodiésel con los parámetros ideales que eviten daños a un motor sería aquella especie de microalga que pueda proporcionar bajo contenido de ácidos grasos saturados para lograr mayor densidad (lo cual se obtuvo en este trabajo), altos porcentajes de ácidos grasos monoinsaturados para estabilidad oxidativa ideal lo cual implicaría bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados. Hoekman en su investigación en 2012 concluye que es imposible definir un perfil de ácidos grasos ideal en un ser vivo como las microalgas que cumpla con parámetros definidos, establecidos y deseables en el biodiésel, siendo lo más recomendable una estabilidad proporcionada entre ácidos grasos saturados e insaturados minimizando los poliinsaturados. Lo más recomendable finalmente, es caracterizar los lípidos para determinar grado de acidez y porcentaje de humedad, producir el biodiésel y determinar los parámetros fisicoquímicos de alto impacto bien para uso único como combustible o bien mezclado con diésel de petróleo.

7.13 Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyo de beca otorgado a uno de los integrantes para realizar estudios de posgrado (Maestría), al Programa para el Desarrollo Profesional Docente para el tipo Superior (PRODEP) por apoyo a proyecto Nuevo PTC y a Laboratorios de la U.A. de Ingeniería en Biotecnología UPSIN, México por préstamo de equipos y materiales para la realización de varios ensayos necesarios en este trabajo.

7.14 Conclusiones

Se determinó que el medio de nutrientes de Guillard es el ideal para la cepa de microalga *Dunaliella tertiolecta* ya que presentó densidad celular, absorbancia, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación dentro de los rangos publicados en investigaciones referentes, además de proporcionar una muy buena cantidad de biomasa. El medio Erdschreiber también es recomendable de acuerdo con los resultados obtenidos, pero posiblemente brinde una mayor tasa de crecimiento en función del tiempo modificando algunos parámetros fundamentales como la intensidad de luz y el fotoperíodo de forma tal de estudiar el comportamiento de propagación de la microalga más allá del día once o que en ese tiempo mejore la densidad celular promedio.

La floculación con hidróxido de sodio resultó ser un agente químico excelente para la extracción de la biomasa microalgal, lo que representa un aporte de esta investigación, ya que la literatura solo la reporta para microalgas del género *Nannochloropsis* y los métodos de recuperación de la biomasa generada por *Dunaliella* y otros géneros requieren de mayor tiempo lo que hace que el gasto energético se incremente. A partir de la metodología implementada se logró un alto porcentaje de recuperación de biomasa microalgal en un tiempo bastante corto, además el hidróxido de sodio es un compuesto químico bastante económico y de fácil adquisición.

La obtención de la biomasa microalgal conllevó a la extracción de la fracción lipídica celular empleando la sonicación combinada con una extracción con solventes a partir del método Bligh & Dyer y lograr en un tiempo de veinte minutos que toda la biomasa expuesta quedara completamente seca.

El perfil de la fracción lipídica obtenida estuvo compensado por la presencia de ácidos grasos saturados y en mayor proporción por los ácidos grasos insaturados lo cual coincide con pocas investigaciones referentes a la misma especie de microalga de este trabajo (*Dunaliella tertiolecta*), de otras especies del mismo género como *Dunaliella salina*, de otros géneros de microalgas y de cultivos vegetales como la soja y grasas animales residuales. El perfil obtenido contiene porcentajes muy aceptables de los ácidos grasos idóneos (C12 a C18) para la transesterificación y obtención de biodiésel, en cuyo caso el paso siguiente es llevar a cabo dicha producción y caracterizar el producto a través de los parámetros fisicoquímicos fundamentales establecidos en los lineamientos mexicanos anexos a la Ley para la promoción y desarrollo de los bioenergéticos para entonces conocer la influencia del ácido linolénico (el de mayor proporción en el perfil obtenido) sobre la estabilidad oxidativa que es la de mayor impacto en el uso del combustible bien sea puro o mediante compensación si se mezclara con el diésel fósil.

A partir de los resultados, la cepa de la microalga *Dunaliella tertiolecta* analizada tiene potencial energético para la producción de biodiésel de tercera generación bajo las condiciones de trabajo descritas, sin embargo, esto quedaría totalmente establecido una vez analizada la estabilidad oxidativa bien sea a partir de la caracterización de los lípidos o la producción de biodiésel. Finalmente, y con base en el análisis se puede determinar la viabilidad de la escala piloto bajo condiciones ambientales y el aprovechamiento de la energía solar de la región de Sinaloa para aminorar costos en producción masiva.

7.15 Referencias

Andía-Cárdenas, Y. (2000). Tratamiento de agua. Coagulación y floculación. SEDAPAL S.A. Lima, Perú. Recuperado de: <http://www.sedapal.com.pe>.

Arana, I., Orruño M., Barcia I. (2012). Diluciones y concentraciones. Muestras líquidas y sólidas en Cómo abordar y resolver aspectos prácticos de microbiología. Departamento de inmunología.

Microbiología y parasitología, Universidad del País Vasco. ISSN: 2255-2316. Recuperado de: <https://ocw.ehu.eus/course>.

Araujo, G. S., Matos, L., Fernandes, J., Cartaxo S., Gonçalves L. R.B., Fernandes F., Farias, W. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrason Sonochem*, 20(1) 95-99. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.027.

Archanaa, S., Moise, S., Suraishkumar, G. K. (2012). Chlorophyll interference in microalgal lipid quantification through the Bligh and Dyer method. *Biomass and Bioenergy*, 46, 805-808. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.07.002.

Arias, M. T., Martínez, A.J., Cañizares, R. O. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biol. Colomb*, 18(1), 43-68. ISSN: 1900-1649.

Baldiris-Navarro, I., Sanchez Aponte, J. H., Torres Virviescas, M. (2017). Validation, characterization and comparison of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* growth kinetics. *International. Journal. of Chem Tech Research*. 10(15), 411-420. ISSN: 2455-9555.

Calderón, A., Serpa, F. (2003). Efectos del paraquat sobre el crecimiento y la morfología de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Ecol. Apl.*, 2(1), 99-102. ISSN: 1726-2216.

Chen, M., Tang, H., Ma H., Holland, T., Simon, K., Salley, S. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1649-1655. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.09.062.

Comisión Reguladora de Energía. (18/12/2019). Resolución Núm. RES/1817/2019: resolución de la comisión reguladora de energía que otorga a Pemex transformación industrial una ampliación al plazo para el cumplimiento de la especificación de contenido de azufre en el diésel automotriz, previsto en la norma oficial mexicana NOM-016-CRE-2016, especificaciones de calidad de los petrolíferos. Recuperado de: <http://drive.cre.gob.mx>.

Comisión Reguladora de Energía, (2018). Acuerdo A/065/2018. Recuperado de: <https://www.gob.mx/cre/prensa>.

Coutteau, P. (2013). *Algal production in Micro-Algae*. Food and Agriculture Organization.

Diario Oficial de la Federación. (29/08/2016). Acuerdo por el que la CRE expide la Norma Oficial Mexicana NOM-016-CRE-2016, Especificaciones de calidad de los petrolíferos. Recuperado de: <https://www.dof.gob.mx>.

Diario Oficial de la Federación. (22/10/2018). Lineamientos por los que se establecen las especificaciones de calidad y características para etanol anhidro (bioetanol), biodiésel y bioturbosina puros. Recuperado de: <https://www.dof.gob.mx>.

El Arroussi, H., Benhima, R., Bennis, I., El Mernissi, N., Wahby, I. (2015). Improvement of the potential of *Dunaliella tertiolecta* as a source of biodiesel by auxin treatment coupled to salt stress. *Renewable energy*. 77, 15-19. DOI: 10.1016/j.renene.2014.12.010.

Estrada, G. (2013). Evaluación del potencial uso de biomasa de las diferentes cepas de microalgas del Atlántico de Guatemala en diferentes áreas de la industria (Tesis de Maestría, Universidad de San Carlos de Guatemala) Repositorio institucional Universidad de San Carlos de Guatemala. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/7782/1>.

Godoy-Hernández, G., Vázquez-Flota, F.A. (2006). Growth measurements. En Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. (Eds) *Plant Cell Culture Protocols*. Methods Mol Biol. 318. Pp. 51-58. Humana Press. ISBN: 978-1-59259-959-2.

Harith, Z.T., Yusoff, F.M., Mohamed, M. S., Shariff, M., Din, M., Ariff, A. B. (2009). Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. *African J. of Biotechnology*, 8 (21), 5971-5978. DOI: 10.5897/AJB09.1396.

Hoekman, K. S., Broch A., Robbins, C., Cenicerros, E., Natarajan, M. (2011). Review de biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16(1), 143-169. DOI: 10.1016/j.rser.2011.07.143.

Instituto Mexicano para la Competitividad A.C. (IMCO). (2015). La NOM 044: retos y oportunidades para su cumplimiento. Recuperado de: <https://imco.org.mx>.

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2018). Informe Nacional de Calidad del Aire 2017, México. Coordinación General de Contaminación y Salud Ambiental, Dirección de Investigación de Calidad del Aire y Contaminantes Climáticos. Ciudad de México, México. Recuperado de: <https://sinaica.inecc.gob.mx>.

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2019). Impacto ambiental del contenido de azufre en el diésel vehicular comercializado en México. Coordinación General de Contaminación y Salud Ambiental, Dirección de Investigación de Calidad del Aire y Contaminantes Climáticos. Ciudad de México, México. Recuperado de: <https://www.gob.mx>.

King, P.M. (2014). The use of ultrasound on the extraction of microalgal lipids. Tesis de Coventry University, Coventry: Disponible en: <https://curve.coventry.ac.uk>.

Liu, J., Tao, Y., Wu, J., Zhu, Y., Gao, B., Tang, Y., Li, A., Zhang, C., Zhang, Y. (2014). Effective flocculation of target microalgae with self-flocculation microalgae induced by pH decrease. *Bioresource Technol*, 167, 367-375. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.06.036.

López-Elías J.A., Fimbres-Olivarría, D., Medina-Juárez, L.A., Miranda-Baeza, A., Martínez-Córdova, L.R., Molina-Quijada, D.M.A. (2013). Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. *PHYTON Int. J. of Exp. Botany*, 82, 23-30. ISSN: 0031 9457.

Melgar México. Datos del parque vehicular en México, septiembre 30 de 2019, 9:05 AM <https://www.portalautomotriz.com>.

Moreira, E. (2012). Principales características de las materias primas utilizadas en la producción de biodiesel: la influencia del contenido y la concentración de los ácidos grasos. *Ingenium Rev. Fac. Ing.* 13(25), 53-61- DOI: 10.21500/01247492.1307.

Neto, C.R.L.A.L., Silva, P.E.C., Bezerra, R.P., Marques, D.A.V., Neves, A.L.S., Neto, N.S.O., Carvalho, J.C.M., Porto, A.L.F. (2012). Effects of different cultures medium on *Dunaliella tertiolecta* Growth. 52 Congreso Brasileiro de Química. Recuperado de: <http://www.abq.org.br>.

Nowotarski, K., King, P.M, Joyce E.M., Mason T.J. (2012). Ultrasonic disruption of algae cells. *AP Conference Proceedings*. 1433.

Oficina de Eficiencia Energética y Energía Renovable USA (2010) Ultra-Low Sulfur Diesel. Recuperado de: <https://www.fueleconomy.gov>.

Pinzi, S., García, I.L., López-Gimenez, F. J., Luque, M.D., Dorado G., Dorado, M.P. (2009). The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: A review of social, economic and technical implications. *Energy Fuels*, 23(5), 2325-2341. DOI: 10.1021/ef801098a.

Ramírez, G. (18/12/2019). CRE permite a Pemex seguir produciendo diésel sucio por cinco años más. *El Sol de México*. Recuperado de: <https://www.elsoldemexico.com.mx>.

Rojo-Cebreros, A.H., Morales-Plascencia, M. E., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J.M, Medina-Jasso, M.A. (2016). Floculación de *Nannochloropsis* sp. inducida por hidróxido de sodio: eficiencia de floculación, efecto sobre la viabilidad microalgal y su uso como alimento para rotíferos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44(4), 662-670. DOI: 10.3856/vol44-issue4-fulltext-1.

Sánchez-Bayo, A. (2019). Biorrefinería de microalgas para la producción de biocombustibles (Tesis de Doctorado, Universidad Rey Juan Carlos). Repositorio institucional Universidad Rey Juan Carlos. Disponible en: <https://eciencia.urjc.es/handle/10115/16209>.

Secretaría de Energía (2015). Refinación. Recuperado de: <https://www.gob.mx/sener>.

Secretaría de Energía. (2019). Balance Nacional de Energía 2018. Subsecretaría de Planeación y Transición Energética, Dirección General de Planeación e Información Energéticas. Ciudad de México, México. Recuperado de: <https://www.gob.mx>.

Shuping, Z., Yulong, W., Mingde, Y., Kaleem, I., Chun, L., Tong, J. (2010). Production and characterization of bio-oil from hydrothermal liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* cake. *Energy*, 35 (12), 5406-5411. DOI: 10.1016/j.energy.2010.07.013.

Soto-León. S., Zazueta-Patrón, I. E., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C. y Contreras-Andrade I. (2014). Extracción de lípido de *Tetraselmis suecica*: proceso asistido por ultrasonido y solventes. *Rev Mex Ing Quím*, 13(3), 723-737. ISSN: 1665-2738.

SP Industries Inc. (2009). Freeze dryer operator's manual. Recuperado de: <https://www.americaninstrument.com>.

State Key Laboratory of Marine Environmental Science (MEL), Xiamen University. 2015. f/2 Medium (Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975). Recuperado de: <https://mel.xmu.edu.cn>

Suarsini, E., Sunbandi. (2011). Utilization ultrasonic to increase the efficiency of oil extraction for microalgae indigenous isolates from pond gresik, east java. Proceedings of the 2011 IEEE Conference on Clean Energy and Technology (CET).

Talebi, A. F., Mohtashami, S. K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Mirzaei, H. H., Mirzajanzadeh, M., Shafaroudi S. M., Bakhtiari, S. (2013). Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*, 2(3), 258-267. DOI: 0.1016/j.algal.2013.04.003.

Tang, H., Abunasser, N., Garcia, M. E. D., Chen, M., Simon Ng, K. Y. y Salley, S. O. (2011). Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. *Applied Energy*, 88(10), 3324-3330. DOI: 10.1016/j.apenergy.2010.09.013.

Tejada, C., Tejada-Benítez, L., Villanova A., Monroy, L. (2013). Obtención de biodiesel a partir de diferentes tipos de grasa residual de origen animal. *Rev. Luna Azul* (36).10-25. ISSN: 1909-2474.

Tejada-Benítez, L. Henao-Argumedo D., Alvear-Alayón M., Castillo-Saldarriaga C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Rev. Fac. Ing.* 24(39), 43-54. ISSN 0121-1129.

Ummalyma S.B., Matthew, A. K. Pandey, A. Sukumaran, K. (2016). Harvesting of microalgal biomass: Efficient method flocculation through pH modulation. *Bioresource Technology*. 213, 216-221. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.03.114.

Universidad de Texas. Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin, USA. Recuperado de: <https://utex.org/product>.

Universidad de Waterloo. Canadian Phycological Culture Centre for algae, cyanobacteria and lemma. Recuperado de: <https://uwaterloo.ca/canadian-phycological-culture-centre/cultures>.