



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

---

FACUTAD DE CIENCIAS

**“IMPLEMENTACIÓN DE MEMBRANA ZIF 7 COMO  
CATALIZADOR EN LA REACCIÓN DE  
TRANSESTERIFICACIÓN DE ACIDOS GRASOS  
PROVENIENTES DE LA MICROALGA  
*Scenedesmus Obliquus*”**

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

**SALVADOR CABRAL HERNÁNDEZ**

ASESOR DE TESIS:

**DR. VICTOR VARELA GUERRERO**

ASESOR EXTERNO:

**DR. EDGAR VILLAGRAN VARGAS**

---

---



# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
CAPÍTULO I. BIODIESEL .....	3
1.1 MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL .....	3
1.1.1 ACEITES Y GRASAS .....	3
1.1.2 OBTENCIÓN DEL BIODIESEL POR EL METODO DE TRANSESTERIFICACIÓN .....	4
1.1.3 CATÁLISIS DE LA REACCIÓN .....	5
1.1.4 CATÁLISIS BÁSICA .....	5
1.1.5 CATÁLISIS ÁCIDA .....	6
1.1.6 CATÁLISIS ENZIMÁTICA .....	7
1.2 PROPIEDADES DEL BIODIESEL .....	7
1.2.1 VISCOSIDAD .....	8
1.2.2 PUNTO DE NIEBLA .....	8
1.2.3 DENSIDAD .....	9
1.2.4 PUNTO DE INFLAMABILIDAD .....	9
1.2.5 CONTENIDO DE AZUFRE.....	9
1.2.6 NÚMERO DE CETANO .....	10
1.2.7 ACIDEZ DEL BIODIESEL.....	10
1.2.8 PODER CALORÍFICO DEL BIODIESEL.....	10
1.3 IMPACTO AMBIENTAL DE LA COMBUSTION DEL BIODIESEL .....	11
CAPÍTULO II. MICROALGAS VERDES COMO MATERIA PRIMA EN LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL .....	13
2.1 MICROALGAS .....	13
2.2 CONTENIDO LIPÍDICO DE LAS MICROALGAS Y SU PRODUCTIVIDAD.....	13
2.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y FÍSICAS DEL ACEITE DE MICROALGA .....	15
2.4 SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN MICROALGAS .....	16
2.5 VENTAJAS DEL USO DE MICROALGAS EN LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL.....	17
CAPÍTULO III. CULTIVO DE MICROALGAS .....	18
3.1 MÉTODOS DE CULTIVO .....	18
3.1.1 ESTANQUES ABIERTOS .....	18

3.1.2 FOTOBIOREACTORES .....	20
3.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE LAS ALGAS .....	21
3.2.1 DIÓXIDO DE CARBONO .....	21
3.2.2 AGUA Y NUTRIENTES .....	22
3.2.3 INTENSIDAD DE LUZ .....	23
3.2.4 TEMPERATURA .....	23
3.2.5 pH .....	24
CAPÍTULO IV. <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	25
4.1 CENOBIOS Y CRECIMIENTO CELULAR .....	25
4.2 PERFIL BIOQUÍMICO Y LIPÍDICO PRESENTE EN <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	26
4.3 CONDICIONES DE ESTRÉS PARA AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	27
4.3.1 LIMITACIÓN DE NUTRIENTES .....	27
4.3.2 TEMPERATURA .....	28
CAPÍTULO V. ESTRUCTURAS ZEOLÍTICAS DE IMIDAZOL .....	29
5.1 CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES EN LA SÍNTESIS DE MEMBRANAS ZIF .....	30
5.1.1 EFECTOS DEL SOPORTE .....	30
5.1.2 EFECTOS DE LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DEL SOPORTE .....	30
5.1.3 EFECTO DE LOS DESPROTONADORES Y SOLVENTES .....	31
5.1.4 ACTIVACIÓN DE LA MEMBRANA .....	31
5.2 CLASIFICACIÓN DE LA SINTESIS DE MEMBRANAS ZIF .....	32
5.2.1 CRECIMIENTO <i>IN SITU</i> SOBRE SOPORTES NO MODIFICADOS .....	32
5.2.2 CRECIMIENTO <i>IN SITU</i> SOBRE SOPORTES MODIFICADOS .....	32
5.2.2 CRECIMIENTO SECUNDARIO .....	33
5.3 CATALIZACIÓN DE LA TRANSESTERIFICACIÓN MEDIANTE EL USO DE MEMBRANAS ZIF .....	33
HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	35
CAPÍTULO VI. METODOLOGÍA DEL CULTIVO, RECOLECCIÓN DE BIOMASA Y EXTRACCIÓN DE LÍIDOS INTRACELULARES .....	36
CAPÍTULO VII. METODOLOGÍA DE PRODUCCIÓN DE BODIESEL .....	41
CAPÍTULO VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	48
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES .....	55

BIBLIOGRAFÍA .....	55
--------------------	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REACCIÓN GENERAL DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DE TRIGLICERIDOS CON ALCOHOL .....	5
FIGURA 2. MECANISMO DE TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITES VEGETALES CATALIZADA POR ÁCIDOS .....	6
FIGURA 3. ESQUEMA DEL PROCESO DE SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN MICROALGAS .....	17
FIGURA 4. ESQUEMA DE ESTANQUE ABIERTO .....	19
FIGURA 5. FOTOBIOREACTOR DE TIPO HELICOIDAL .....	21
FIGURA 6. CENOBIO DE <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	26
FIGURA 7. ESQUEMA DEL PROCESO DE SÍNTESIS DE MEMBRANAS ZIF .....	33
FIGURA 8. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA EXPERIMENTACIÓN EN EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA .....	36
FIGURA 9. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL .....	41
FIGURA 10. CRECIMIENTO DE CRISTALES EN EL SOPORTE .....	43
FIGURA 11.....	44
FIGURA 11 a). MEMBRANA CATALÍTICA ZIF 7 SOBRE CUBREOBJETOS .....	44
FIGURA 11 B). MEMBRANA CATALÍTICA ZIF 7 SOBRE SOPORTE $\alpha$ -ALÚMINA .....	44
FIGURA 12. PROCESO CONTINUO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL .....	46
FIGURA 13. CELDA TÉRMICA .....	46
FIGURA 14. MICROGRAFÍA DE <i>Scenedesmus obliquus</i> 40x .....	49
FIGURA 15. SUPERFICIE Y CORTE TRANSVERSAL DE MEMBRANA ZIF 7 .....	49
FIGURA 16. DIFRACTOGRAMA DE LA MEMBRANA ZIF 7 .....	50
FIGURA 17. ESTRUCTURA DEL ÁCIDO PALMÍTICO .....	50
FIGURA 18. ESPECTRO DEL ÁCIDO PALMÍTICO .....	51
FIGURA 19. ESPECTRO DEL BIODIESEL OBTENIDO .....	52
FIGURA 20. SOPORTE CON CRISTALES ZIF 7 DESPUES DE LA REACCIÓN .....	54

# ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PRINCIPALES ÁCIDOS GRASOS EN LOS TRIGLICÉRIDOS .....	4
TABLA 2. REDUCCIÓN DE EMISIONES DE BIODIESEL VS DIESEL .....	12
TABLA 3. COMPARACIÓN DE MICROALGAS VS MATERIAS PRIMAS DEL BIODIESEL .....	14
TABLA 4. PROPIEDADES DEL ACEITE DE MICROALGAS .....	15
TABLA 5. CANTIDAD DE ACEITE EN PESO SECO DE MICROALGAS .....	15
TABLA 6. PERFIL BIOQUÍMICO DE LA MICROALGA <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	26
TABLA 7. PERFIL BIOQUÍMICO DE LA MICROALGA <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	27
TABLA 8. NORMALES CLIMATOLÓGICAS 1991-2015 .....	39
TABLA 9. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN LOS PRIMEROS 25 DÍAS DE CULTIVO .....	48
TABLA 10. PRODUCCIÓN DE BIOMASA DURANTE EL SEGUNDO CRECIMIENTO .....	48
TABLA 11. PRODUCCIÓN DE BIOMASA BAJO ESTRÉS EN INVERNADERO .....	48

*“Agradezco a mis Padres, Carmen y Salvador, por su infinito apoyo, por su amor, por creer en mí en todo momento a pesar de los tropiezos. Por sus enseñanzas y por darme siempre los medios necesarios para llegar hasta este punto de mi vida. Sin ustedes no sería posible.*

*A mi hermano, Samuel, mi mejor amigo y mi compañero de aventuras, por su apoyo incondicional y sobre todo por su amor que me hace ser fuerte.*

*A Montse, por su cariño y consejos, por escucharme siempre sin importar cuanto dijera, por su confianza. Gracias por creer en mí.*

*Agradezco especialmente al Dr. Edgar, por permitirme ser parte de este proyecto y la confianza que siempre depositó en mí desde un principio, y al Dr. Víctor, por compartir sus conocimientos conmigo, por su paciencia y por apoyarme siempre hasta la conclusión de este proyecto.*

*A todos los integrantes del laboratorio de materiales, sobre todo a la Dra. María Fernanda y al Dr. Fernando por su apoyo durante la parte experimental de mi trabajo.*

*Y finalmente al Dr. Eberto Novelo por su atención y calidez en todo momento.”*

Salvador.

**“IMPLEMENTACIÓN DE MEMBRANA ZIF 7 COMO CATALIZADOR  
EN LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN DE ÁCIDOS  
GRASOS PROVENIENTES DE LA MICROALGA *Scenedesmus  
obliquus*”**





## Resumen.

El aceite de la microalga verde *Scenedesmus obliquus* fue utilizado para la producción de biodiesel implementando en el proceso de conversión de sus ácidos grasos como catalizador heterogéneo las membranas ZIF 7. Las cuales pertenecen a una tecnología nueva de materiales órgano-metálicos.

El cultivo de la microalga proveída por el laboratorio de algas continentales de la Universidad Autónoma Nacional de México se realizó en tres etapas. Durante las dos primeras se realizó el escalamiento en condiciones óptimas de cultivo, mientras que en la última se indujeron las condiciones de estrés. Teniendo un rendimiento promedio de 24.66 g/L de biomasa después de 17 días de cultivo en condiciones mixotróficas.

El tiempo de reacción de conversión de los ácidos grasos a biodiesel se calculó en 45 min. durante los cuales se vertió el aceite de la microalga diluido en metanol en una relación 1:1 sobre los cristales ZIF 7 situados en la superficie del soporte de alfa-alúmina en una celda térmica a una temperatura constante de 60°C.

La identificación del producto final se realizó mediante la técnica de RMN calculando una conversión del 62.01% con relación a 15 mL de aceite de microalga utilizados.

La obtención de biodiesel utilizando el aceite de microalgas e implementando este tipo de catalizadores tiene como ventaja el hecho de que no es necesario separar el catalizador del producto final y asegura una producción más rápida en comparación a los tiempos de reacción mediante el uso de catalizadores homogéneos. Por otra parte, el uso de microalgas como materia prima de este biocombustible tiene un impacto ambiental favorable y es completamente sustentable.

Cabe mencionar que hasta el momento no existen trabajos que relacionen el uso de la membrana ZIF como catalizador en el proceso de transesterificación de ácidos grasos provenientes del aceite de microalgas.

## Introducción.

Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), México ocupa el lugar 14 a nivel mundial en reservas de petróleo crudo. Con el nivel de producción actual de petróleo, estimado en 663 millones 250 mil de barriles al año, se calcula que el petróleo durará aproximadamente 11 años más. En nuestro país cerca del 88% de la energía primaria proviene del petróleo, lo que representa la principal fuente de producción de combustibles utilizados en el sector de transporte e industria (INEGI, 2016). Aunado a esto, en 2016, en el Estado de México a consecuencia de las emisiones generadas por los combustibles fósiles se reportaron índices elevados de contaminación por partículas suspendidas de menos de 2.5 micras (PM2.5) por sus siglas durante el primer trimestre del año, lo cual determina una mala calidad ambiental (RAMA, 2016).

Como una alternativa a la reducción de estos índices contaminantes y a la reducción de la dependencia a los hidrocarburos de petróleo, los biocombustibles pueden ser una solución viable a estos problemas. Los biocombustibles más producidos en la actualidad son el biodiesel y la biogasolina. Los cuales pueden sustituir a los combustibles fósiles de forma parcial o total y así, favorecer la disminución de emisiones contaminantes derivadas de su combustión.

El biodiesel es fabricado principalmente mediante aceites vegetales, pero dado a que la mayoría de los cultivos vegetales usados son de consumo humano, esto produce un aumento en el costo de los alimentos y además aumenta el precio del biodiesel, lo cual es una desventaja frente al diésel convencional. Por esta situación se buscan nuevas materias primas, como lo es el caso del aceite de microalga.

En el capítulo I se detallan las particularidades y características del biodiesel, así como las materias primas utilizadas en la actualidad para la producción de este biocombustible, además, se describen las reacciones químicas de la obtención mediante el uso de catalizadores básicos, ácidos y se analiza la posibilidad del uso de enzimas como mediadores de la reacción.

En el capítulo II se hace referencia a las microalgas como materia prima para la producción de biodiesel y se mencionan las cualidades que presentan los cultivos de estos organismos comparándolos con los cultivos convencionales actuales. Mientras que en el capítulo III se detalla la técnica de cultivo de microalgas y se abordan los elementos clave para una producción adecuada.

En los capítulos IV y V se muestran generalidades sobre la cepa de microalgas *Scenedemus obliquus* y su uso potencial como materia prima, sobre las estructuras zeolíticas de imidazol y sus características como catalizadores heterogéneos respectivamente.

## **CAPITULO I. BIODIESEL**

El termino biodiesel, se refiere a un combustible proveniente de fuentes biológicas y que es equivalente al diésel de petróleo. Químicamente, el biodiesel se define como esteres monoalquílicos con cadenas largas de ácidos grasos derivados de biolípidos renovables. El biodiesel es producido generalmente mediante la reacción de aceites vegetales o grasas animales con metanol o etanol en presencia de un catalizador para generar metil o etil esteres (dependiendo del alcohol utilizado) y glicerina. (Demirbas A. , 2002). Generalmente el metanol es el alcohol más usado para realizar la transesterificación debido a que es más barato que el etanol (Graboski, 1998). Las grasas animales y los aceites vegetales son compuestos orgánicos insolubles en agua e hidrofóbicos que están compuestos por una molécula de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos y comúnmente se les denomina triglicéridos (Sonntag et al., 1979a).

El biodiesel, es biodegradable, no tóxico y además su combustión libera un bajo perfil de emisiones, lo cual es benéfico para el ambiente (Krawczyk et al., 1996).

### **1.1 Materia prima para la obtención de biodiesel**

En la actualidad, existe un gran potencial de materia prima para la producción de biodiesel. Las plantas comestibles oleaginosas son el principal recurso para la producción mundial de biodiesel, en incluso se ha estudiado la posibilidad del uso de grasas animales siendo estas, las menos usadas debido a la dificultad de su obtención (Bala et al., 2005).

#### **1.1.1 Aceites y Grasas**

Químicamente los aceites y grasas consisten en triglicéridos, moléculas de tres cadenas largas de ácidos grasos que se encuentran unidos por un enlace éster a una molécula de glicerol. Estos ácidos grasos difieren en la longitud de sus cadenas de carbonos, así como en el número, orientación y posición de los dobles enlaces en las cadenas (Meher. L.C, 2010).

Los triglicéridos como los principales constituyentes de las grasas y aceites vegetales corresponden aproximadamente al 90% e inclusive hasta un 98% de la masa total de los aceites. En la molécula de un triglicérido el glicerol tiene un peso molecular de 41 g, mientras que un radical de ácido graso pesa alrededor de 650 a 790 g. De esta forma se puede apreciar que los ácidos grasos forman una gran parte del peso molecular del triglicérido, lo cual se refleja en las características de los aceites (Canacki., 2008).

Como ya se mencionó antes, los ácidos grasos varían en la longitud de la cadena de carbono y en el número de dobles enlaces (grado de insaturación), y se denota con letras y números (Cx:X). La letra seguida de un número representa el número de átomos de carbonos en la cadena del ácido graso y el número después de los

dos puntos hace referencia al número de dobles enlaces. Por ejemplo, C18:3 (ácido linoleico) implica que el ácido graso tiene 18 átomos de carbono y 3 dobles enlaces (Canacki., 2008).

Los ácidos grasos que comúnmente se encuentran en las moléculas de triglicéridos se presentan la tabla 2:

ÁCIDO GRASO	FORMULA
MIRÍSTICO	(14:0)
PALMÍTICO	(16:0)
ESTEÁRICO	(18:0)
LINOLEICO	(18:2)
LINOLEICO	(18:3)
ARAQUIDÓNICO	(20:0)
BEHÉNICO	(22:0)
ERUCICO	(22:1)

**Tabla 1**  
**Principales ácidos grasos encontrados en los triglicéridos.**  
 (Canacki., 2008)

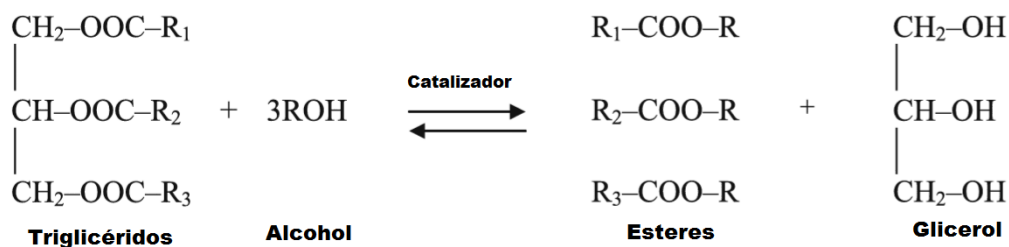
### 1.1.2 Obtención de Biodiesel por el método de transesterificación

La transesterificación, también llamada alcoholisis es la reacción de una grasa o un aceite con un alcohol para formar ésteres y glicerol. La reacción ocurre en presencia de un catalizador que se utiliza para mejorar la velocidad y rendimiento de la reacción. Entre los alcoholes que pueden ser usados en el proceso de transesterificación destacan el metanol, etanol, propanol, butanol e inclusive el alcohol alílico. Con frecuencia, se prefiere utilizar metanol y etanol, pero en la mayoría de los casos se utiliza el metanol debido a su bajo costo y a sus ventajas físicas y químicas (alcohol polar y de cadena corta). Debido a estas características el metanol puede reaccionar con los triglicéridos. Y el NaOH usado generalmente como catalizador se disuelve con facilidad.

Estequiométricamente es necesario tomar en cuenta la proporción 3:1 de alcohol-triglicéridos para completar la reacción (Wright, 1994).

La transesterificación es el proceso de intercambio del grupo alcoxi de un éster por otro alcohol. Estas reacciones son catalizadas por la adición de una base o un ácido. Las bases catalizan la reacción removiendo un protón del alcohol, por lo cual se vuelve más reactivo, mientras que un ácido puede catalizar la reacción donando un protón al grupo carbonil volviéndolo más reactivo. (Schuchardt, 1998)

A continuación, en la figura 1. Se muestra la reacción general de la transesterificación.



**Fig. 1**  
**Reacción general de la transesterificación de triglicéridos con alcohol.**  
 (Schuchardt, 1998)

### 1.1.3 Catálisis de la reacción

Los aceites vegetales pueden ser transesterificados mediante calor y la presencia de alcoholes y un catalizador. Numerosos estudios han mostrado que la reacción química puede ser catalizada por bases, ácidos o enzimas. Y de esto dependerá el proceso químico involucrado en la formación de esteres alquílicos.

Entre los catalizadores básicos o alcalinos se incluyen el NaOH, KOH, carbonatos correspondientes a sodio y potasio, alcóxidos como metóxido de sodio, etóxido de sodio entre otros.

En la catálisis acida se emplea el ácido sulfúrico, ácido sulfónico, ácido clorhídrico, por mencionar algunos. El catalizador se disuelve en el alcohol mediante una agitación vigorosa en pequeños reactores y posteriormente se vierte al aceite.

Las lipasas son otra alternativa para ser empleadas en el proceso llamado biocatálisis (Schuchardt, 1998).

### 1.1.4 Catálisis básica

Los esteres en presencia de bases como iones alcóxidos, forman un intermediario anionico, el cual puede disociarse al éster original o formar uno nuevo. La transesterificación puede ocurrir entonces por este mecanismo.

La transesterificación catalizada por una base a diferencia del uso de ácidos, se produce más rápido. El primer paso es la reacción de la base con el alcohol produciendo un alcóxido y un catalizador protonado. El ataque nucleofílico del alcóxido en el grupo carbonil del triglicérido genera un intermediario tetraédrico, por el cual el alquil éster y el anion de diglicérido son formados.

Consecutivamente los diglicérido y monoglicéridos son convertidos por el mismo mecanismo en una mezcla de ésteres alquílicos y glicerol (Demirbas A. , 2002).

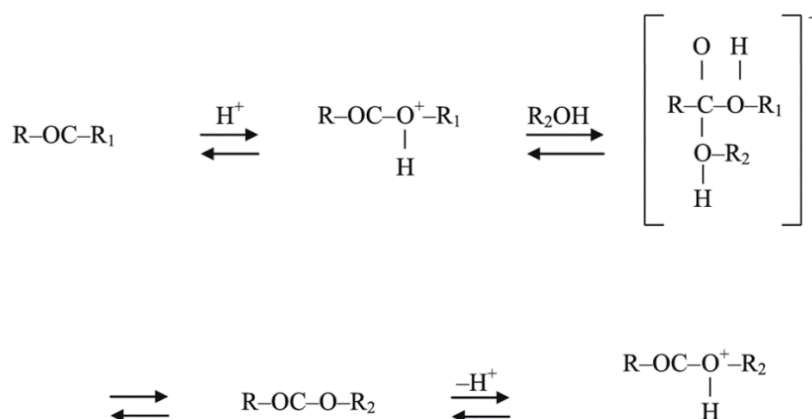
El uso de alcóxidos metálicos alcalinos como el metóxido de sodio ( $CH_3ONa$ ) favorece la catálisis de la reacción. El rendimiento que se obtiene es mayor al 98% de conversión en un corto tiempo (30 min.) incluso si es empleado a una concentración molar baja (0.5 mol%). Sin embargo, el uso de este método requiere la ausencia de agua, por lo cual su uso en procesos industriales resulta poco favorable (Schuchardt, 1998).

Por otro lado, los hidróxidos metálicos como el KOH y NaOH son más baratos que los alcóxidos metálicos, pero menos atractivos. La presencia de agua aumenta la posibilidad de hidrólisis de los ésteres que se formen, con la consecuencia de la formación de jabones. Lo anterior repercute en el rendimiento de la reacción y hace muy difícil la recuperación del glicerol (Demirbas A. , 2008).

### 1.1.5 Catálisis ácida

La transesterificación es catalizada por ácidos de Brønsted, preferentemente por ácido sulfúrico y ácido sulfónico. Esta catálisis provee un rendimiento muy alto en la formación de ésteres alquílicos, pero la reacción es lenta. La proporción molar alcohol/aceite vegetal es uno de los principales factores que influyen en la transesterificación. Un exceso de alcohol favorece la formación de ésteres alquílicos, pero este exceso dificulta la recuperación del glicerol al final de la reacción, así que la proporción alcohol/aceite debe ser establecida empíricamente.

La reacción de conversión de triglicéridos a ésteres alquílicos comienza con la protonación del ácido para donar un ion hidronio, el cual puede someterse a una reacción de intercambio con un alcohol para formar un intermedio, y este puede perder un protón para convertirse en un éster. Cada paso en este proceso es reversible, pero en presencia de un exceso de alcohol el punto de equilibrio de la reacción es desplazado y el proceso de transesterificación se convierte en una competición (Demirbas A. , 2008). En la Fig. 2 se muestra la reacción general de transesterificación de aceites vegetales catalizada por ácidos.



**Fig. 2**  
**Mecanismo de transesterificación de aceites vegetales catalizada por ácidos**  
 (Christie, 1989)

### **1.1.6 Catálisis enzimática**

Como se mencionó al inicio de este capítulo, la transesterificación puede llevarse a cabo en presencia de catalizadores básicos o ácidos, pero también pueden utilizarse enzimas en especial lipasas provenientes de bacterias, hongos y animales.

En trabajos recientes las lipasas producidas por los organismos *Chromobacterium viscosum*, *Candida rugosa* así como las lipasas producidas en el páncreas porcino fueron empleadas en la producción de biodiesel a partir del aceite de jaratrofa en un sistema libre de solventes. En el estudio solo la lipasa proveniente de la bacteria *Chromobacterium viscosum* mostró un rendimiento significativo (Shah, 2004).

La inmovilización de la lipasa bacteriana se realizó en celite-545 obteniendo un rendimiento del 71% a comparación del 62% de rendimiento obtenido al usar una preparación con la enzima libre en un proceso de 8 horas a 113 K (Shah, 2004).

Aunque la transesterificación catalizada por enzimas no es un proceso que se realice a escala comercial, nuevos resultados se han reportado en artículos recientes y patentes. Los aspectos más comunes que se han estudiado consisten en optimizar las condiciones de la reacción (solventes, temperatura, pH, tipo de microorganismo que genera la enzima, etc.)

Sin embargo, el rendimiento de la reacción y el tiempo en la misma continúan siendo desfavorables comparada con la catálisis alcalina o ácida (Schuchardt, 1998).

### **1.2 Propiedades del biodiesel**

Las propiedades técnicas del biodiesel se han especificado por la Sociedad Americana de pruebas y materiales, (ATSM) por sus siglas en inglés en decretos mediante los cuales se buscan establecer los parámetros para asegurar la calidad del biocombustible. La medición de los parámetros finales del biodiesel favorecerá su uso, almacenamiento y comercio de este, además de asegurar que los sistemas diésel donde sea utilizado no sufrirán daños durante su funcionamiento.

El biodiesel se caracteriza por su viscosidad, densidad, número de cetano, su punto de nube, punto de inflamabilidad, contenido de azufre, acidez y su alto poder calorífico (HHV). Las variables más importantes que afectan el rendimiento del éster en el proceso de transesterificación son la proporción del alcohol con relación al aceite vegetal utilizado y la temperatura de la reacción. Para la medición de las propiedades estándar de calidad del biodiesel se utiliza como referencia al biodiesel puro comúnmente denominado (B100) (Carraretto C, 2004)

### **1.2.1 Viscosidad**

La viscosidad es una propiedad física característica de todos los fluidos que surge de las colisiones entre las partículas del fluido que se mueven a diferentes velocidades, provocando una resistencia a su movimiento (Hatschek, 1968)

Dado a que las propiedades del biodiesel son similares a las del diésel de petróleo. La viscosidad es la propiedad más importante dado a que afecta la operación de los equipos de inyección de combustible, particularmente a temperaturas bajas cuando la viscosidad aumenta, la fluidez del combustible se ve afectada. En los dispositivos de combustión diésel una viscosidad alta supone una pobre combustión, en cambio una viscosidad menor favorece su combustión y por lo tanto el funcionamiento del motor (Islam, 2004)

En cuanto a la viscosidad del biodiesel, esta suele disminuir al final de la reacción de transesterificación en comparación a la viscosidad que caracteriza a los aceites con el que se elabora (Demirbas A. , 2008)

Datos reportados por la Sociedad Americana de pruebas y materiales (ATSM) en el decreto D6751-08a correspondiente a los valores de calidad en el biodiesel establecen que el límite aceptable para la viscosidad del biocombustible a 40°C es de entre 1.9 a 6.0  $mm^2/s$  (Energy, 2010).

### **1.2.2 Punto de niebla**

Los combustibles, en su mayoría, al estar expuestos a bajas temperaturas experimentan cambios importantes en su consistencia, esto debido a que las parafinas contenidas en los combustibles forman pequeños cristales que ocasionan la restricción del uso de ellos. El punto de niebla o punto de nube se refiere a la temperatura más baja en la cual se comienzan a formar estos cristales. (Armas, 2011)

Conocer el punto de niebla permite saber los rangos de temperatura en los cuales el biodiesel puede comenzar a congelarse y con ello dañar los dispositivos de inyección. Se calcula que el punto de niebla del biodiesel es mayor al del diésel convencional, por lo cual se sugiere el uso de aditivos que retarden la congelación de biocombustible. El punto de niebla está determinado por los ácidos grasos que forman al biodiesel. La ATSM en el decreto D2500 generaliza que el punto de niebla para la mayoría de los metil ésteres provenientes de aceites vegetales se encuentra entre 0 y -1°C. (Energy, 2010).



### **1.2.3 Densidad**

La densidad del biodiesel es un parámetro muy importante para asegurar la calidad del combustible. Conocer la densidad es de gran relevancia para una correcta formulación de la mezcla de materias primas que optimicen el costo de producción (Pratas, 2011).

La temperatura juega un papel importante en la densidad y la viscosidad del biodiesel, a medida que la temperatura aumenta la densidad y la viscosidad disminuye y cuando la temperatura desciende los valores de estas propiedades aumentan (Demirbas A. , 2008).

Según los estándares de calidad de la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ATSM) la densidad promedio del biodiesel a una temperatura de 15.5°C es de 7.3 lb/gal (Energy, 2010). A comparación con la densidad del diésel convencional según la misma fuente la diferencia que existe entre las densidades es de 0.2 lb/gal.

### **1.2.4 Punto de inflamabilidad**

El punto de inflamabilidad se define como el conjunto de condiciones del entorno en que una sustancia combustible inflamable, está en condiciones de iniciar su combustión si se le aplica una fuente de calor a suficiente temperatura llegando al punto de ignición. El punto de inflamabilidad se diferencia al punto de ignición en que en el primero el combustible está en condiciones de inflamarse, pero le falta el calor de ignición. Una vez retirada la fuente de calor pueden ocurrir dos cosas: que la combustión continúe o que se detenga (Energy, 2010).

El punto de inflamabilidad del biodiesel disminuye al final de la reacción de transesterificación con relación al de los aceites utilizados para su elaboración. Conocer esta propiedad permite tener un aproximado de la cantidad de alcohol residual que contiene el biodiesel después de la reacción de obtención (Demirbas A. , 2008).

El punto de inflamabilidad del biodiesel se encuentra entre los 100 y 170°C, por lo que el biodiesel se considera un combustible seguro en cuanto a su uso y almacenamiento. Tomando en cuenta que la temperatura a la que inicia su combustión es aproximadamente lo doble al del punto de inflamabilidad del diésel convencional (60-80°C) (Energy, 2010)

### **1.2.5 Contenido de azufre**

El contenido de azufre permite reducir emisiones contaminantes de sulfatos y ácido sulfhídrico y proteger el sistema de escape de estas emisiones en los motores diésel. Para una adecuada función de los filtros en los motores diésel, se requiere que el contenido de azufre sea de 15 ppm o menos. Generalmente el biodiesel contiene menos de 15 ppm de azufre (Energy, 2010). La ASTM registra que el biodiesel contiene 0.0015 % de azufre con relación a la masa.

El departamento del medio ambiente de Australia señala que el 99% de los gases contaminantes de azufre presentes en la atmosfera provienen de la actividad relacionada al uso de combustibles fósiles (Energy, 2010).

### **1.2.6 Número de Cetano**

El número de cetano es una magnitud de calidad en la ignición de los combustibles diésel. Un alto número de cetano implica una ignición más rápida. El número de cetano está basado en dos compuestos, el hexadecano, con un número de cetano de 100 y el heptametilnonano, con un número de cetano de 15 (Bala, 2005). El número de cetano es un parámetro para determinar la calidad de la ignición del diésel y es equivalente al porcentaje por volumen del cetano en la mezcla con heptametilnonano, la cual se compara con la calidad de ignición del combustible prueba (Energy, 2010).

El número de cetano del biodiesel es generalmente más alto que el del diésel convencional. Entre más largas sean las cadenas de los ácidos grasos y más saturadas sean las moléculas, mayor será el número de cetano. (Bala, 2005).

El biodiesel presenta un número de cetano entre 48 y 65 mientras que el valor del diésel de petróleo es de 40 a 55, Según la ASTM en decreto de prueba ATSM D6751.

### **1.2.7 Acidez del biodiesel**

La acidez en el biodiesel es el principal indicador de ácidos grasos libres (productos de la degradación natural de grasas y aceites). Este valor puede ser elevado si la producción del biocombustible no se realiza adecuadamente o si este sufre una degradación oxidativa. Para fines de calidad en el producto final, la acidez del biodiesel debe ser máximo 0.50 mg KOH/g (Agency, 2002) .

### **1.2.8 Poder Calorífico del biodiesel**

El oxígeno contenido en el biodiesel mejora el proceso de combustión y disminuye su potencial de oxidación. El contenido estructural de oxígeno de un combustible favorece su eficiencia de combustión debido a un incremento en la homogeneidad del oxígeno con el combustible durante la combustión. Gracias a esto la eficiencia de combustión del biodiesel es mayor a la del diésel, además la eficiencia en la combustión del metanol/etanol es más alta que el de la gasolina.

El biodiesel contiene 11% de oxígeno por peso y no contiene azufre. Por lo tanto, el uso del biodiesel puede extender la vida de los motores diésel dado a que se encuentra más lubricado que cuando se usa diésel de petróleo.

El poder calorífico del biodiesel (HHV) son relativamente altos. El HHV del biodiesel está calculado entre 39 a 41 MJ/Kg y se encuentra ligeramente por debajo del de la

gasolina (46 MJ/Kg), diésel de petróleo (43 MJ/Kg) e incluso del petróleo (42 MJ/Kg) (Demirbas A. , 2008).

### 1.3 Impacto ambiental de la combustión del biodiesel

El impacto ambiental de las emisiones generadas en la combustión del biodiesel depende del tipo de materia prima, ya sea maíz, soya o en este caso aceite de microalga con la que se elaboró el biocombustible (Rakopoulos D.C., 2008).

El biodiesel promueve reducciones significativas en partículas suspendidas y monóxido de carbono (CO) en comparación al diésel de petróleo. Además de causar un leve incremento o decrecimiento en óxido de nitrógeno (N<sub>2</sub>O), esto dependiendo en el tipo de motor y en el procedimiento de la prueba (Laforgia, 1994).

El uso de biodiesel en dispositivos diésel reduce sustancialmente las emisiones de hidrocarburos crudos en un 90%, monóxido de carbono, sulfatos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, e hidrocarburos aromáticos nitrogenados en un 75% y 90% a comparación del diésel (Rakopoulos D.C., 2008)

El uso del biodiesel con la finalidad de reducir las emisiones de  $N_2O$  resulta atractivo por muchas razones. La primera, el biodiesel contiene menos nitrógeno a comparación del diésel. El biodiesel se caracteriza por su baja concentración de sulfuros, por lo tanto, las emisiones de  $SO_2$  se pueden reducir de manera significativa usando al biodiesel para reemplazar al diésel de petróleo (Urbanchuk, 2013).

Según datos de la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de Norte América, el total de las emisiones de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) en la combustión del biodiesel es menor a comparación de las emisiones del diésel convencional. Aunado a esto, la energía que se utiliza durante el proceso de producción del biodiesel es menor, lo cual convierte a este biocombustible en una opción viable y sustentable. El  $CO_2$  es uno de los principales gases de efecto invernadero que una vez emitidos por alguna fuente de combustión se dispersa en la atmosfera por procesos naturales (Carraretto C, 2004).

El biodiesel puede ser una perfecta opción para reemplazar al diésel, pero también se pueden hacer algunas mezclas de biodiesel-diésel para reducir las emisiones contaminantes, comúnmente las mezclas se denotan  $B_x$  en donde x es el porcentaje de biodiesel utilizado en la mezcla.

En la siguiente tabla se describe las emisiones del biodiesel puro (B100) en el cual se utilizó semillas de soya como materia prima y una mezcla 80-20% de biodiesel y diésel respectivamente (B20) (Carraretto C, 2004).

Tipo de emisión	Biodiesel puro	20% biodiesel + 80
	B100	B20
Hidrocarburos crudos totales	-67	-20
Monóxido de Carbono	-48	-12
Partículas Suspendidas	-47	-12
$NO_x$	+10	+2
Sulfatos	-100	-20
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	-80	-17

**Tabla 2**  
**Reducción de emisiones de biodiesel (%) comparado con diésel convencional**  
**Adaptado de** (Carraretto C, 2004)

## **CAPITULO II. MICROALGAS VERDES COMO MATERIA PRIMA EN LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL.**

### **2.1. Microalgas**

Dentro de las microalgas se distinguen cuatro grupos comúnmente: diatomeas (Bacillariophyceae), las cuales forman parte del fitoplancton; algas verdes (chlorophyceae) las cuales se consideran como precursores de las plantas superiores; algas azules (Cyanophyceae), fijadoras de nitrógeno atmosférico y las algas doradas (Chrysophyceae), que es común encontrarlas en sistemas de agua fresca al igual que las algas verdes (Sheehan, 1998).

Las microalgas verdes en su mayoría son microorganismos eucariontes fotosintéticos que pueden crecer rápidamente y vivir en condiciones extremas. Las microalgas pueden ser unicelulares o presentar una estructura multicelular simple. Las microalgas están presentes en todos los ecosistemas de la tierra, no solo en los acuáticos y representan una gran variedad de especies. Se estima que existen más de 50,000 especies, pero hasta la actualidad solo se han estudiado aproximadamente 30,000 (Li Y, 2008).

### **2.2 Contenido lipídico de las microalgas y su productibilidad**

Las grasas, así como los ácidos grasos son constituyentes de todas las células de microalgas, en donde sus funciones principales son como componente de la membrana, almacenamiento de productos, como metabolitos y principalmente como una fuente de energía de reserva. La síntesis de lípidos en algas generalmente se realiza por las mismas vías bioquímicas que en las plantas.

La mayor diferencia entre las plantas utilizadas como materia prima en la producción de biodiesel y las microalgas, radica en que las algas son capaces de producir diferentes tipos de ácidos grasos como respuesta a un estrés. Y, además el aceite que almacenan las microalgas proviene de la fotosíntesis, lo cual significa que las vías completas de la fijación de CO<sub>2</sub> hasta la síntesis de triglicéridos pueden ser ajustadas por la célula (Becker, 1994).

Algunas especies de microalgas verdes pueden ser inducidas para acumular sustancialmente mayores cantidades de aceite y así contribuir a un mayor rendimiento de aceite. El promedio del contenido de aceite varía entre 1 y 70% en condiciones normales de cultivo. Pero bajo ciertas condiciones de estrés en la disponibilidad de nutrientes y temperatura del medio de cultivo algunas especies pueden alcanzar un 90% con relación al peso seco de la biomasa (Sheehan, 1998).

Un aspecto significativo además de la cantidad de aceite que pueden almacenar en su célula las microalgas, es la composición de los ácidos grasos de las distintas especies, y como estos pueden tener un efecto significativo en las características del biodiesel producido. (Becker, 1994)

Los ácidos grasos pueden ser saturados e insaturados de entre 12 y 22 átomos de carbono. La composición típica de los ácidos grasos presentes en las especies empleadas para la producción de biodiesel muestra que son capaces de sintetizar C14:0, C16:0, C18:1, C18:2 y C18:3. En la tabla 3 se compara la cantidad de aceite de microalgas (en rojo) en comparación a cultivos tradicionales para la producción de biodiesel.

Fuente de obtención	Contenido de aceite en la semilla (% aceite por peso seco)	Rendimiento del aceite. (L de aceite/ hectárea por año)	Producción de biodiesel (kg biodiesel/ hectárea por año)
Maíz	44	172	152
Soya	18	636	562
Canola	41	974	862
Girasol	40	1070	946
Aceite de palma	36	5366	4747
Microalga (bajo contenido de aceite)	30	58,700	51,927
Microalga (medio contenido de aceite)	50	97,800	86,515
Microalga (alto contenido de aceite)	70	136,900	121,104

**Tabla 3**  
**Comparación de microalgas con otras materias primas para biodiesel.**  
(Mata M.T., 2009)

### 2.3 Características químicas y físicas del aceite de microalga.

Como se ha mencionado antes, las microalgas son capaces de producir ácidos grasos de longitudes de cadena variada, los cuales van de los 5 a 19 carbonos.

En la tabla 4 se muestra la información que concierne a la composición química del aceite de microalga así como algunos parámetros físicos. Es importante mencionar que los autores no hacen referencia al tipo de microalga que se utilizó para el análisis.

Propiedades	Aceite de Microalga
C (%)	61.52
H (%)	8.5
O (%)	20.19
N (%)	9.79
S (%)	---
Densidad (kg/l)	1.16
Viscosidad (Pa*s)	0.10 a 40°C
Poder Calorífico	29

**Tabla 4**  
**Propiedades del aceite de microalga**  
(Amin, 2009)

En la tabla 5 se compara la cantidad de aceite almacenado en el interior de las microalgas verdes con relación a su peso seco de la biomasa donde la microalga *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Neochloris* y *Dunaliella* son las principales especies almacenadoras de aceite, mientras que la especie *Arthrospira* (*Spirulina*) es la especie con menor cantidad.

Microalga	Porcentaje de lípidos en peso seco (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0-55.0
<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6-21.1
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22.7-29.7
<i>Dunaliella sp.</i>	15.5-67.0
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.8
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0-63.0
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0-65.0
<i>Arthrospira máxima</i>	4.0-9.0

**Tabla 5**  
**Cantidad de aceite en peso seco de microalgas.**  
(Mata M.T., 2009)

## 2.4 Síntesis de lípidos en microalgas

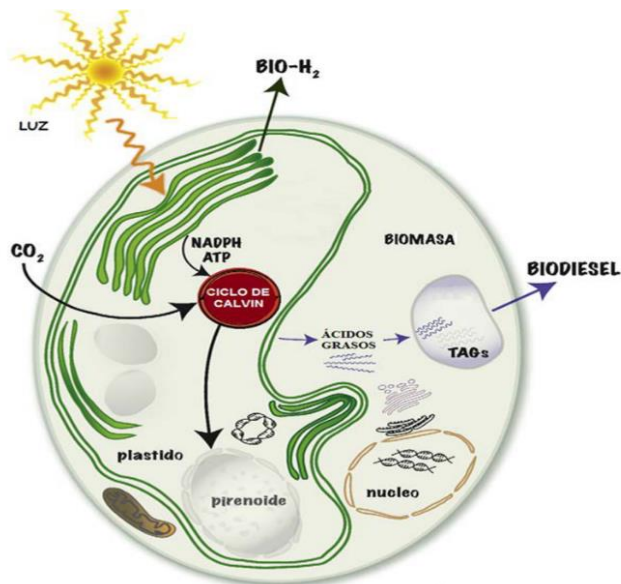
En microalgas verdes, la ruta metabólica para la síntesis de ácidos grasos empieza por la unión del complejo luz-biomasa, el cual está mediado por la clorofila II y carotenoides, los cuales capturan la energía lumínica en forma de fotones. La energía es empleada por el fotosistema II en la oxidación catalítica del agua, formando protones y electrones y  $O_2$  molecular. Los electrones se transportan mediante la cadena de transporte fotosintética para promover la producción de NADPH mediante la reducción de ferredoxina. Dentro del lumen tilacoidal se genera un gradiente electroquímico, debido a la liberación de protones después de la oxidación del agua; el cual se emplea para la formación de ATP mediante la vía ATP sintasa. Los productos de la fotosíntesis NADPH y ATP son sustratos del ciclo de Calvin (Beer, 2009); donde la enzima Rubisco cataliza la conversión de  $CO_2$  y ribulosa-5-fosfato en dos triosas, las cuales son convertidas subsecuentemente en piruvato y acetil-CoA (Staphanopoulos, 2008).

Las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas dentro del cloroplasto por acetil-CoA carboxilasa (ACC) para la síntesis de malonil-CoA. (Hu Q. S., 2008), molécula que es transferida por la proteína acarreadora de grupos acil (ACP) del complejo multi-enzimático sintasa de ácidos grasos (SAG); donde la subunidad cetoacil-ACP sintasa (CAS) cataliza la condensación de malonil-ACP mediante tres reacciones cíclicas: reducción, deshidratación y reducción; condensando el producto con otra molécula de malonil-CoA (Harwood, 2006). El ciclo se repite hasta formar cadenas saturadas de ácido palmítico (16:0) o esteárico (18:0). La enzima ACP-sintasa abre la cadena acil y libera el ácido graso (Scott S. D., 2010).

La formación de triglicéridos se lleva a cabo en el retículo endoplasmático, en organelos especializados llamados plástidos, donde se producen lípidos neutros con la finalidad de almacenar energía y liberar espacio dentro de la célula (Rajakumari, 2008).

La primera reacción para la síntesis de triglicéridos (TAG) es la condensación (acilación) de glicerol-3-fosfato (G3P) con acil-CoA para formar lisofosfatido (LPA), el cual es catalizado por acil-CoA: glicerol-sn-3-fosfato acil transferasa (GPAT) y otra molécula de acil-CoA para producir fosfatidato (PA) (Beer, 2009); (Scott S. D., 2010). Posteriormente el fosfatidato puede ser desfosforilado por la enzima ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) para formar diacilglicerol. Finalmente, la síntesis de TAG es catalizada por acil-CoA: diacilglicerolacil-transferasa (DGAT), la cual incorpora un tercer grupo acil-CoA en la molécula de diacilglicerol, los TAG resultantes son almacenados en cuerpos de aceites (Murphy, 2001), los cuales son la materia prima para obtener biodiesel.





**Fig. 3**  
**Esquema del proceso de síntesis de lípidos en microalgas.**  
 (Beer, 2009)

## 2.5 Ventajas del uso de microalgas en la producción de biodiesel

Las microalgas se reproducen por sí solas utilizando la fotosíntesis para convertir la energía de sol a energía química, completando un ciclo de crecimiento en pocos días (Sheehan, 1998). Además, son organismos que pueden crecer en cualquier lugar requiriendo solamente luz solar y algunos nutrientes simples, aunque la velocidad del crecimiento se puede acelerar con la adición de nutrientes específicos y aireación suficiente (Aslan S, 2006).

Diferentes especies de microalgas pueden adaptarse a vivir en ciertas condiciones ambientales. Así, es posible encontrar especies que respondan a características específicas de crecimiento, lo cual no es posible de hacer con otras materias primas para producir biodiesel.

Las microalgas tienen un rango mayor de crecimiento y productividad a comparación de los recursos forestales, cultivos agrícolas y otras plantas acuáticas, requieren una menor área de cultivo que otras materias primas de origen agrícola, a comparación de la soya, las microalgas producen de 49 a 132 veces más aceite con relación a su peso seco (Tsukahara K, 2005).

En el aspecto ambiental, el cultivo de microalgas favorece la mitigación del  $CO_2$  que las fábricas liberan por un proceso denominado “bio-fijación”, reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero de una compañía o proceso industrial mientras se cultiva la materia prima para el biodiesel. También pueden ser utilizadas como tratamiento en la remoción de  $NH_4$ ,  $NO_3$ ,  $PO_4$ , haciendo que las microalgas crezcan utilizando estos contaminantes del agua como nutrientes (Wang B, 2008).

## CAPITULO III. CULTIVO DE MICROALGAS.

Las microalgas están adaptadas para asimilar los recursos que se encuentren en sus ambientes, almacenarlos o incrementar su eficiencia en la utilización de esos recursos. En general, para el crecimiento de la biomasa de microalgas, la cual consta de 40-50% de carbono es necesaria una eficiente fuente de carbono y luz para llevar a cabo la fotosíntesis (Moheimani N.R, 2006). Sin embargo, pueden ajustar su estructura interna (bioquímica y fisiológicamente), mientras que externamente pueden excretar compuestos, detectar compuestos disponibles o limitar el crecimiento en situaciones adversas (Richmond, 2004).

Las microalgas pueden asumir distintos tipos de metabolismo como el autotrófico, heterotrófico, mixotrófico o fotoheterotrófico. Y son capaces de realizar un cambio en respuesta a una alteración en las condiciones ambientales. Por ejemplo, algunos organismos pueden crecer (Chojnacka K., 2004):

- **Fotoautotróficamente:** utilizando la luz como la única fuente de energía, la cual es convertida a energía química mediante la fotosíntesis.
- **Heterotróficamente:** utilizando únicamente compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía.
- **Mixotróficamente:** Realizando fotosíntesis como la principal fuente de obtención de energía, pero los compuestos orgánicos y el  $CO_2$  son esenciales.
- **Fotoheterotróficamente:** también conocido como fotoorganotrófico o fotometabolismo, describe el metabolismo mediante el cual la luz es requerida para usar compuestos orgánicos como fuente de carbono.

### 3.1 Métodos de Cultivo

#### 3.1.1 Estanques abiertos

El cultivo a gran escala de microalgas usualmente se realiza en estanques al aire libre por lo cual se les denomina “estanques abiertos” en donde los cultivos reciben una fuente de iluminación natural y la fuente de carbono es el  $CO_2$  ambiental. De este modo los costos de mantenimiento y de operación son menores a comparación con los fotobiorreactores.

Las cepas más comunes que se cultivan en estanques abiertos son *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nostoc* y *Scenedesmus* (Verma, 2010).

Los estanques abiertos tienen una gran variedad de formas y tamaños dependiendo de la localización del cultivo, sin embargo, los diseños más comunes para el cultivo de microalgas son los estanques circulares y los estanques en forma de ovalo (Sheehan, 1998).

Las dimensiones estándar sugeridas por el departamento de energía de los Estados Unidos con las que deben contar los estanques son de 10 m de ancho, 100 metros de longitud y 30 cm de profundidad y deben estar construidos con ladrillos y

concreto recubiertos por una membrana gruesa de aproximadamente 10 cm para optimizar el crecimiento de la biomasa.

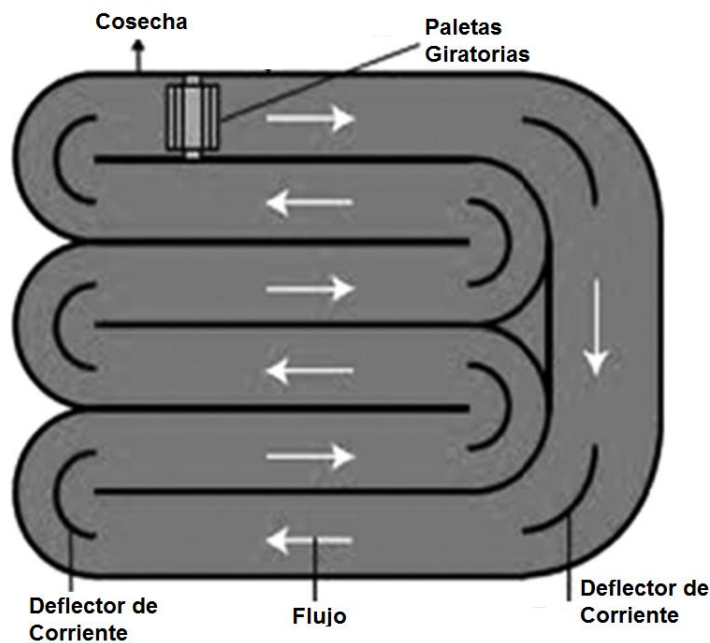
En el caso de los estanques de ovalo o comúnmente llamados de pista, se debe equipar con una paleta o un brazo rotatorio el cual se sitúa a una profundidad de 10-20 cm para mantener el cultivo en agitación, mezclando y previniendo la sedimentación de la biomasa en el fondo del estanque (Verma, 2010).

(Jimenez C, 2003) establece en su trabajo de investigación que el crecimiento máximo de biomasa en los estanques abiertos se logra cuando se encuentran en condiciones tropicales y subtropicales.

La velocidad de crecimiento en los estanques abiertos cualquiera que sea su forma es menor a comparación con un fotobiorreactor. Como señala (Sheehan, 1998) el rango de producción de biomasa en estanques abiertos es de 10-50 gr/día.

Algunas desventajas que presentan los estanques abiertos son que al estar expuestos al aire libre existe pérdida de agua por evaporación, además de que resulta complicado mantener las condiciones óptimas del cultivo.

En la figura 3 se muestra el esquema de un estanque abierto.



**Fig. 4.**  
**Esquema de estanque abierto**  
(Singh, 2012)

### 3.1.2 Fotobiorreactores

Un fotobiorreactor puede describirse como un dispositivo cerrado e iluminado que no tiene intercambios con el ambiente de gases y contaminantes, diseñado para controlar la producción de microalgas. A pesar de que los costos de operación y mantenimiento de los fotobiorreactores son mayores a comparación con los estanques abiertos el uso de estos sistemas tiene mayores ventajas como señala (Singh, 2012):

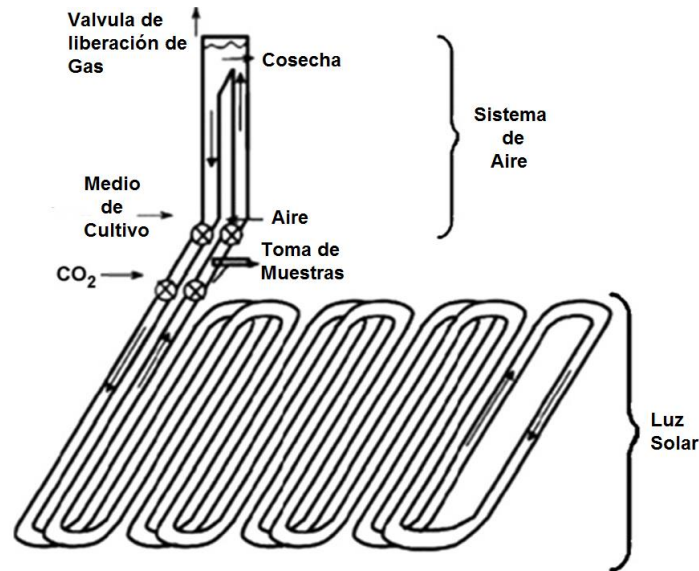
- Minimiza la contaminación y permite mantener anoxénicos los cultivos de microalgas.
- Ofrece un mejor control sobre las condiciones de cultivo como el pH, la temperatura, iluminación, concentración de  $CO_2$ .
- Previene la evaporación del agua y permite una alta concentración de células.
- Existe la posibilidad de situar los dispositivos en lugares donde la fuente de iluminación es la luz solar. Disminuyendo los costos de iluminación artificial.

(Tsoglin, 1996) sugiere los siguientes puntos a tomarse en cuenta para la construcción de un fotobiorreactor:

- El reactor debe permitir el cultivo de varias especies de microalgas
- Los reactores deben de contar con una fuente de iluminación uniforme y una rápida transferencia de masa de  $CO_2$  y  $O_2$ .
- Las células de microalgas se adhieren con facilidad a las superficies de los reactores provocando que la transmisión de la luz sea deficiente con el paso del tiempo, y esto causa que los reactores deban ser apagados para su limpieza y esterilización. El reactor diseñado debe de prevenir la adherencia de las microalgas.
- Se debe garantizar que los dispositivos cuenten con el mínimo de espacios sin iluminación posibles.
- Dado a que las microalgas liberan  $O_2$  como producto de la fotosíntesis, los fotobiorreactores deben de contar con válvulas que permitan la purga del oxígeno acumulado, ya que diversos estudios han demostrado que la saturación de  $O_2$  en los cultivos retarda la producción de biomasa.

La mayoría de los fotobiorreactores constan de un arreglo lineal o helicoidal de tubos hechos de vidrio y plástico o de columnas del mismo material para permitir la transmisión estable de la intensidad de la luz y en los cuales fluye el cultivo de microalgas mediante una bomba de flujo o burbujeo (Pulz, Photobioreactors: productio systems for phototrophic microorganisms., 2001).

La figura 5 es un esquema de un sistema de fotobiorreactor que implementa una fuente de iluminación solar y un sistema de aire que permite la purga del  $O_2$  acumulado.



**Fig. 5**  
**Fotobiorreactor de tipo helicoidal**  
(Singh, 2012)

### 3.2. Factores que influyen en el crecimiento de las microalgas.

Aunque la capacidad de producción de triglicéridos en las microalgas es controlada genéticamente, la cantidad y calidad de aceites producidos por las microalgas es directamente proporcional a los estímulos que reciben de los alrededores.

Los estímulos que influyen directamente en la producción de biomasa y de producción de aceites al mismo tiempo son:  $CO_2$ , el agua, deficiencia de nutrientes, intensidad de luz, pH y temperatura (Borowitzka, 1999).

#### 3.2.1 Dióxido de Carbono

Las microalgas son diez veces más eficientes en la fijación biológica del  $CO_2$  atmosférico que las plantas terrestres (Usui, 1997) y esta eficiencia es altamente variable dependiendo de la especie de microalga que realice la fijación.

La única fuente de carbono en el cultivo de microalgas es el  $CO_2$ . Así los costos de suministrarlo juegan un papel vital en la parte económica de la producción de biodiesel. Con la finalidad de optimizar el crecimiento de las microalgas, el  $CO_2$  necesita ser proveído en concentraciones altas que pueden ser alcanzadas bajo condiciones naturales (Pulz, 2007). Los gases liberados por la industria del acero y de las centrales térmicas tienen una concentración mayor de  $CO_2$  que el aire normal;

el seleccionar cepas de microalgas que sean altamente tolerantes al dióxido de carbono es una de las mejores estrategias para mejorar la factibilidad del proceso de producción desde el punto de vista económico (Verma, 2010).

### 3.2.2 Agua y Nutrientes

El crecimiento de las microalgas se debe esencialmente a los nutrientes que se encuentran en el agua del cultivo. El agua que comúnmente se utiliza es agua tratada o aguas residuales. De este modo las microalgas no compiten con otros organismos por agua fresca y así, el uso de aguas residuales como medio de cultivo puede considerarse como remediación biológica del agua. Se han realizado numerosos estudios en los cuales se ha utilizado aguas residuales para el crecimiento de microalgas, especialmente para remoción de sales de nitrógeno y fósforo de los efluentes. (Hernandez, 2006); (Abdel-Hameed, 2007); (Shi, 2007). En adición al nitrógeno y fósforo otros estudios han demostrado la capacidad de las microalgas de remover metales pesados de las aguas contaminadas, tal como lo muestra (Shi, 2007) y (Muñoz, 2006).

El nitrógeno, así como los fosfatos son dos macronutrientes importantes para el crecimiento y metabolismo de las microalgas. El nitrógeno es un elemento fundamental para la formación de proteínas y ácidos nucleicos. Siendo una parte integral de moléculas esenciales como el ATP y acarreadores de energía en la célula. El nitrógeno inorgánico tomado por las algas es rápidamente asimilado dentro de compuestos bioquímicamente activos y reciclado dentro de las células para satisfacer las cambiantes necesidades fisiológicas.

Los fosfatos son otro nutriente importante en las cadenas de ADN y ARN, las cuales son macromoléculas esenciales para la vida de las células y además son un componente clave de los fosfolípidos. (Harris, 1986)

Generalmente la deficiencia de nitrógeno tiene grandes efectos en la síntesis y acumulación de lípidos y ácidos grasos. Mientras que la deficiencia de fósforo resulta en la mejora de la calidad de lípidos en ciertas especies de microalgas (Saha, 2003). Mientras que (Otsuka, 1961) estudió la escasez de sulfuro en el medio en las especies *Chlamydomonas reinhardtii* y en *Chlorella spp.* Y resultó en una mejoría en el contenido total de los lípidos.

El hidrógeno y oxígeno son dos nutrientes no minerales. La abundancia de ambos en el medio de cultivo permite saber que su presencia no es un reto para el crecimiento o el metabolismo de las microalgas.

Los metales traza, son metales presentes en las células de las algas en cantidades demasiado pequeñas (<4ppm) pero son un componente esencial de la fisiología.

El Hierro (Fe), Magnesio (Mn), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Cobre (Cu) y Níquel son seis de los metales traza más importantes para las funciones metabólicas de las microalgas.

Las deficiencias de metales traza pueden limitar el crecimiento, mientras que un exceso o una concentración alta inhibiría el crecimiento, reducir la producción de antioxidantes y ocasionar daño en la membrana celular (Parent, 1991).

### 3.2.3 Intensidad de la luz

Durante el crecimiento fotoautotrófico de las microalgas la luz es la principal fuente de energía. Estos organismos usan la luz para convertir el dióxido de carbono a compuestos orgánicos, especialmente en azúcares. Las microalgas pueden crecer bajo diferentes intensidades de luz. Sin embargo, solo el uso de luz de alta intensidad favorece la bioproducción de lípidos neutros principalmente triglicéridos. En contraste los lípidos polares son formados ante la presencia de luz de baja intensidad. Cerca del 45% del total del espectro de la luz consiste en radiación fotosintéticamente activa, en consecuencia, puede ser utilizada por la microalga para capturar el  $CO_2$  (Gao, 2007).

La luz solar está disponible en diferentes cantidades según sea la localización geográfica. Los estanques abiertos deben situarse en aquellas regiones donde la luz solar es abundante e interrumpida. En el caso de los fotobiorreactores, la luz solar puede proveer mediante recolectores solares, concentradores solares y fibras ópticas (Scott A. B., 2006). No obstante, con la final de reducir los costos en la producción del biodiesel, el crecimiento de la biomasa de microalgas debe realizarse utilizando luz solar.

### 3.2.4 Temperatura

La temperatura es quizás uno de los factores ambientales más importantes que intervienen en el crecimiento de las microalgas, en el tamaño de las células, su composición bioquímica e inclusive en los requerimientos nutrimentales.

La temperatura juega un papel importante en la fotoinhibición, lo cual repercute en la tasa de crecimiento del alga. Se sabe que existe una relación entre la tasa de crecimiento y la temperatura. Cuando la temperatura sube, la tasa de crecimiento es mayor y viceversa.

La temperatura de crecimiento óptima, depende de la especie o cepa de microalga (Renuand, 2002).

El crecimiento a una temperatura óptima favorece la utilización del carbono y nitrógeno dentro de la célula, (Raven, 1988) señala que los cultivos de microalgas que se realizan a una temperatura por debajo a la óptima tienen una menor eficiencia en la utilización de carbono y nitrógeno, lo cual se debe a los cambios en la viscosidad del citoplasma.

Uno de los cambios más observados con el cambio de temperatura es la alteración en el nivel de insaturación de los ácidos grasos en la membrana lipídica. Las bajas temperaturas disminuyen la fluidez en la membrana celular. Las células entonces lo compensan incrementando el nivel de fluidez de los ácidos grasos insaturados. Sin embargo, esto provoca que las membranas sean más susceptibles al daño por radicales libres (Raven, 1988).

Se ha reportado que la temperatura también tiene impacto en el contenido de almidón en el interior de la célula. Los almidones son sintetizados por metabolitos fosforilados durante las reacciones del ciclo oscuro de la fotosíntesis usando

enlaces de fosfato ricos en energía (por ejemplo, ATP) formado en las reacciones en presencia de luz (Emerson, 1994).

### 3.2.5 pH

El pH al igual que la temperatura es uno de los factores más importantes en el cultivo de microalgas debido a que determina la solubilidad y disponibilidad del  $CO_2$  y de nutrientes esenciales y debido a esto el pH tiene un impacto significativo en el metabolismo del alga. Un crecimiento máximo de biomasa se logra a pH neutros, aunque el pH óptimo para un cultivo es el pH inicial al cual un alga puede iniciar su crecimiento. El cambiar el pH en el medio puede limitar el crecimiento por una inhibición metabólica (Goldman, 1982).

Notablemente el pH es el mejor factor para determinar las concentraciones relativas de especies carbonatadas en el agua. Cuando el pH es alto disminuye la disponibilidad del  $CO_2$  (Chen, 1994), el cual como se ha visto anteriormente limita el crecimiento celular. En cultivos fotoautotróficos la sustitución del  $CO_2$  tomado de la fotosíntesis es más lenta. Lo cual resulta en una disminución de la presión parcial de  $CO_2$  y por lo tanto conduce a un aumento del pH (Pruder, 1979)

El pH alcalino incrementa la flexibilidad de la pared celular de las células madre, lo cual evita su ruptura e inhibe la liberación de autoespora, aumentando el tiempo en el ciclo celular y, además, indirectamente aumenta la acumulación de triglicéridos, pero disminuyen los lípidos polares asociados a la membrana debido a la inhibición del ciclo celular (Guckert, 1990).



## CAPÍTULO IV. *Scenedesmus obliquus*

*Scenedesmus*, es un género de microalgas, específicamente de las clorofíceas o algas verdes, las cuales reciben este nombre debido a la clorofila contenida dentro de la célula. Generalmente forma colonias y son microalgas que no poseen movilidad. En la actualidad existen 74 especies de *Scenedesmus* aceptadas taxonómicamente (Guiry, 2015). Adicionalmente varios subgéneros han sido identificados, pero varían de acuerdo con la fuente. (Hegewald, 1997) denota *Acutodesmus*, *Desmodesmus* y *Scenedesmus*, como las tres principales. *Acutodesmus* se caracteriza por tener células con polos agudos mientras que *Desmodesmus* y *Scenedesmus* son células con polos obtusos y truncos (diferenciados por la presencia o ausencia de espinas respectivamente). Las células de *Scenedesmus* contienen un solo plástido con un pirenoide y se caracterizan por ser uninucleares.

Los restos fósiles de *Scenedesmus* que se conocen datan de 70 a 100 millones de años. Mientras que *Desmodesmus* se supone como la especie más joven de estos tres grupos.

*Scenedesmus* es uno de los géneros más comunes de agua dulce; sin embargo, las muy diversas morfologías entre las especies hacen difícil su identificación. Mientras la mayoría de las especies pueden ser encontradas alrededor del mundo, existen ciertas especies locales como es el caso de *Scenedesmus intermedius* y *Scenedesmus serratus* las cuales se pueden encontrar en Nueva Zelanda (Lüiring, 1999).

*Scenedesmus obliquus* se caracteriza por ser células dispuestas linealmente alternadas, en 2 o 3 filas, tocando entre ellas mediante las paredes laterales o en la región subpolar solamente. Las células de 3-78 x 2-10 micras, con morfología casi esférica o elipsoidal, alargadas y fusiformes. Los polos son circulares, obtusos o inclusive ligeramente agudos y estrechos (Tsarenko, 2011).

### 4.1 Cenobios y Crecimiento celular

*Scenedesmus obliquus*. puede existir como una célula única; generalmente se le encuentra en cenobios de cuatro u ocho células dentro de una pared materna. Los cenobios de acuerdo a su ordenamiento se han descritos como lineares, irregulares o alternados.

La formación de cenobios depende de varios factores. Una gran proporción de organismos unicelulares han sido encontrados en cultivos expuestos a una alta intensidad de luz y temperaturas altas, lo que sugiere que, en tasas de crecimiento más altas, los organismos prefieren no ser colonizados (Lüiring, 1999).

La reproducción asexual es mediante la formación de autocolonias en donde las células maternas se dividen en células no flageladas que se alinean lateralmente alrededor de la pared materna.

Las autocolonias son liberadas por el rompimiento de la pared celular materna. Una colonia simple es capaz de producir tantas autocolonias como el número de cenobios existentes (Graham, 2000).



**Fig. 6**

**Cenobio de *Scenedesmus obliquus* en el que se aprecia la morfología de las células, así como el cloroplasto parietal, un pirenoide y gotas de aceite dispersas.**

Tomado de: [http://www.algaebase.org/search/images/detail/?img\\_id=o07d3e839f5cbfc4b](http://www.algaebase.org/search/images/detail/?img_id=o07d3e839f5cbfc4b)

#### **4.2 Perfil bioquímico y lipídico presente en *Scenedesmus obliquus***

En las tablas siguientes se muestra el perfil bioquímico y lipídico correspondiente a la cepa de *Scenedesmus obliquus*.

Como se puede observar en la tabla 17 se reporta la presencia principalmente de ácidos grasos saturados y monoinsaturados desde C16 a C18.

PERFIL BIOQUÍMICO	%
<b>HIDRATOS DE CARBONO</b>	<b>28</b>
<b>PROTEÍNAS</b>	<b>25</b>
<b>CLOROFILA</b>	<b>0.8</b>
<b>LÍPIDOS NEUTROS</b>	<b>20</b>
<b>LÍPIDOS POLARES</b>	<b>18</b>

**Tabla 6**

**Perfil bioquímico de la microalga *Scenedesmus obliquus*.**  
(Cervantes, 2013)

PERFIL LIPÍDICO	%
<b>C16:0</b>	<b>30.2</b>
<b>C16:1N</b>	<b>7.3</b>
<b>C17:1</b>	<b>4.0</b>
<b>C18:0</b>	<b>0</b>
<b>C18:1N9T</b>	<b>19.5</b>
<b>C18:1N9C</b>	<b>26.2</b>
<b>C18:3N6</b>	<b>12.8</b>

**Tabla 7**

*Perfil lipídico de la microalga Scenedesmus obliquus en condiciones de cultivo normales. C16:0 (ácido palmítico), C16:1n (ácido palmitoleico), C17:1 (ácido heptadecanoico), C18:0 (ácido esteárico), C18:1n9t (ácido eláidico), C18:1n9c (ácido oleico), C18:3n6 (ácido c-linoleico). (Cervantes, 2013)*

### **4.3 Condiciones de estrés para aumentar la producción de biomasa y aceite en *Scenedesmus obliquus***

#### **4.3.1 Limitación de Nutrientes**

La disponibilidad de nutrientes tiene un impacto significativo en el crecimiento y propagación de las microalgas, así como efectos en la composición de los lípidos y ácidos grasos intracelulares. La limitación de nutrientes se considera una condición de estrés que causa una disminución constante en la tasa de división. Sorpresivamente, la biosíntesis de ácidos grasos continua activa bajo circunstancias adversas, siempre y cuando la fuente de luz y  $CO_2$  sea suficiente para llevar a cabo la fotosíntesis. Cuando las microalgas se encuentran bajo estas condiciones de estrés, generalmente los depósitos de ácidos grasos son convertidos a triglicéridos. Bajo estas condiciones la producción de triglicéridos funciona como un mecanismo de protección (Thompson, 1996).

El nitrógeno es uno de los nutrientes que afectan de manera significativa el metabolismo de lípidos en las algas. Existe una tendencia general a la acumulación de lípidos, particularmente triglicéridos, en respuesta a una deficiencia de nitrógeno, la cual ha sido observada en numerosas especies o cepas de varias microalgas (Yeh, 2011). En su trabajo, (Hu Q. , 2006) condujo un estudio sobre la respuesta al estrés generado por el nitrógeno en ciertas microalgas, diatomeas y cianobacterias y todas las especies analizadas mostraron incrementos significativos en la producción de lípidos. (Rodolfi, 2009), plantea un modelo de crecimiento de cultivos a gran escala con inducción en la producción de lípidos mediante la limitación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) en ciertos tipos de microalgas; en donde destaca la microalga *Scenedesmus obliquus*. Que al encontrarse bajo ausencia de estos dos nutrientes mostro un incremento en los lípidos celulares de entre un 30% a un 53% respectivamente.

### 4.3.2 Temperatura

La temperatura es una de las condiciones claves que afectan la producción de biomasa, la acumulación de lípidos y la composición de los ácidos grasos. Además, el factor de estrés de la temperatura puede jugar un rol muy importante en los procesos metabólicos en la síntesis de lípidos. (Juneja, 2013). En un estudio publicado por (Han, 2016) donde se analizó la respuesta que tiene *Scenedesmus* al ser sometido a temperaturas de 35°C sobre la tasa de producción de biomasa, acumulación de lípidos y las características de estos. Se encontró que el género *Scenedesmus* tiene un aumento en su tasa de producción de biomasa en un 50% a comparación de su crecimiento en las temperaturas óptimas (20-25°C).

Basado en el estudio de (Bohnenberger, 2014) quien demostró que este género de microalga puede presentar un aumento en su producción total de lípidos cuando el crecimiento se realiza en medios de cultivo ricos en Nitrógeno a una temperatura de 30°C.

## CAPÍTULO V. ESTRUCTURAS ZEOLÍTICAS DE IMIDAZOL (ZIF)

Las estructuras metálicas-orgánicas por sus siglas en inglés MOF son materiales cristalinos orgánicos-inorgánicos con poros y canales bien definidos, tienen una porosidad aproximadamente del 50% del volumen del cristal que las forma, una densidad baja ( $0.2-1 \text{ g/cm}^3$ ), y un área de superficie que va desde 1000 a los 10,000  $\text{m}^2/\text{g}$ . Las MOF son producidas por síntesis reticular, la cual es el proceso de crear estructuras ordenadas (redes) con enlaces fuertes entre unidades inorgánicas (iones metálicos) y unidades orgánicas (ligandos orgánicos). (Melgar-Aceituno, 2015).

El potencial de las MOF para aplicaciones comerciales se debe a su diversidad estructural, su composición y su morfología. Se componen de ligandos que sirven como bloques, los cuales se ensamblan con iones metálicos para formar unidades estructurales.

La combinación de estructura y composición determina la porosidad del material entre otras propiedades. Estos factores aunados a la morfología son el producto del proceso de síntesis que envuelven el tipo de concentración de ligandos orgánicos, iones metálicos, solvente, y algunos aditivos adicionales o agentes direccionadores de estructuras (Pimentel, 2014).

Las estructuras zeolíticas de imidazol (ZIF) son parte de una nueva clase de MOFs. La presencia de los ligandos orgánicos en la estructura de estas MOFs les brinda funciones químicas que pueden ser usadas para diversas aplicaciones como separaciones enantioselectivas o sensores químicos. Las ZIFs que exhiben estructuras semejantes a las zeolitas están formadas por un metal tetraédrico enlazado a ligandos de imidazol. Se ha reportado que las ZIFs presentan estabilidad química y térmica, cosa que es inusual para la mayoría de las MOFs. (McCarthy, 2010). Las ZIFs están compuestas de iones de metales de transición coordinados tetraédricamente. (Fe, Co, Cu, Zn) conectados por ligandos orgánicos de imidazol. Las estructuras tridimensionales en estas estructuras consisten en cationes (M) de metales tetraédricos como el  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , los cuales están unidos a los ligandos de imidazol (Im) mediante enlaces coordinados. El ángulo entre los cationes y el imidazol (M-Im-M) es similar al ángulo de enlace Si-O-Si ( $145^\circ$ ) en las zeolitas. (Melgar-Aceituno, 2015).

## 5.1 Características importantes en la síntesis de membranas ZIF

Algunas de las características más importantes de las membranas ZIF de alto rendimiento son la continuidad de poro (interconectividad), la ausencia de defectos en la estructura y una buena adherencia al sustrato de la superficie. Las diferentes aplicaciones de las ZIFs y su funcionamiento adecuado son afectadas por varios factores como la orientación de la membrana, composición química del soporte, proceso de activación y el espesor de la membrana (Melgar-Aceituno, 2015).

### 5.1.1 Efectos del soporte

La selección del soporte es muy importante durante la síntesis de las membranas ZIF. Los soportes de cerámica y los poliméricos han sido descritos como los más comunes para la síntesis de estas membranas, sin embargo, los soportes de cerámica son los más usados.

Los soportes cerámicos exhiben una estabilidad mecánica y química excelente, la cual permite su uso en procesos que implican altas temperaturas. Los distintos tipos de soportes cerámicos que se han usado para la síntesis de membranas ZIF incluyen la  $\alpha$ -alúmina,  $TiO_2$ ,  $ZnO$  y  $SiO_2$ . El óxido de titanio es un buen sustituto que promueve la nucleación heterogénea; pero su uso resulta más caro y el material más frágil. El uso de  $\alpha$ -alúmina ofrece una excelente estabilidad mecánica, lo cual permite su extenso uso en la síntesis de membranas ZIF y por esta razón se prefiere como materia para el soporte. Sin embargo, se ha descrito la elaboración de soportes que combinan la estabilidad mecánica de la  $\alpha$ -alúmina y una capa delgada de óxido de titanio.

Otra alternativa para promover la nucleación heterogénea es la modificación del soporte. De hecho, los soportes de  $\alpha$ -alúmina se modifican con ligandos orgánicos para la síntesis de membranas ZIF, con polímeros o una capa de  $ZnO$  para funcionar como la fuente del catión metálico (Melgar-Aceituno, 2015).

### 5.1.2 Efectos en la modificación de la superficie del soporte

La nucleación heterogénea es difícil de lograr en soportes sin modificar. Una estrategia para promover la nucleación es la modificación de la superficie de los soportes, para lo cual existen distintas metodologías. Por ejemplo, los ligandos de imidazol suelen usarse para modificar los soportes y obtener enlaces covalentes fuertes entre el ligando orgánico y el soporte. En adición, el 3-aminopropiltriétoxosilano (APTES) también es usado para modificar los soportes cerámicos. El uso del APTES ha demostrado que realiza un efecto aglutinante entre el soporte y la capa de la membrana, esto durante la síntesis de las membranas ZIF 22.

El 3-aminopropiltriétoxosilano actúa como un ligando covalente entre la membrana y el soporte porque sus grupos etoxi reaccionan con los grupos hidroxilo de  $Al_2O_3$  en la superficie de los soportes. Como resultado la nucleación y el crecimiento de los cristales ocurre en sitios donde los ligandos están presentes (Melgar-Aceituno, 2015).

### 5.1.3 Efectos de los desprotonadores y de los solventes

Una buena integración de los cristales en las membranas ZIF es requerida para obtener una continuidad de poro. Para lograr esto, usualmente se incluyen bases a la solución precursora de la membrana para incrementar el pH de la solución y promover la desprotonación completa de los ligandos de imidazol, el cual permite el crecimiento de las membranas en todas las direcciones. El formiato de sodio es el desprotonador que más se utiliza y su uso fue propuesto por primera vez por (McCarthy, 2010), quienes investigaron a gran detalle el papel del formiato de sodio in la síntesis de membranas ZIF-8, demostrando que este compuesto y las sales de zinc forman una capa de  $ZnO$  en los soportes de  $\alpha$ -alumina, la cual actual como sitios de nucleación para la cristalización de las membranas y como una fuente adicional de Zn. (Melgar-Aceituno, 2015).

Después de que la nucleación heterogénea se realiza, el formiato de sodio sirve como un desprotonador para obtener una buena integración de las membranas ZIF-8. De igual manera el hidróxido de amonio se ha utilizado como promotor para la desprotonación del 2-metilimidazol y promotor de la nucleación en la síntesis de membranas ZIF-8.

Para el caso de la síntesis de membranas ZIF-7 la polietilenimina puede ser usada para promover el enlace entre el soporte y los cristales, o bien para desprotonar los ligandos orgánicos pues la polietilenimina contiene grupos amino en su estructura (Yan-Shuo, 2010).

Los tres solventes más usados en la síntesis de membranas ZIF incluyen la dimetilformamida (DMF), el metanol y el agua. La selección del solvente adecuado para sintetizar satisfactoriamente el tipo de membrana deseado se considera una tarea difícil. Actualmente se buscan nuevas alternativas para la utilización de solventes amigables con el ambiente. Se ha reportado en varios estudios la síntesis de membranas ZIF-8 con agua como solvente en la solución precursora (McCarthy, 2010).

### 5.1.4 Activación de la membrana

La activación es considerada como un paso crítico durante la síntesis de las membranas ZIF. La activación consiste en remover las moléculas de los solventes que pueden obstruir la membrana, normalmente se realiza con solventes de bajo peso molecular, por ejemplo, el metanol.

Considerando el hecho de que la concentración de moléculas obstructoras en el metanol es cero, una gran concentración de gradiente existirá y entonces la velocidad de la transferencia de masa será mayor. Esta velocidad de transferencia de masa provocará el transporte más rápido de las moléculas que obstruyen la membrana hacia la mayor concentración de metanol, en consecuencia, esto dañara la estructura de la ZIF conduciendo a un pobre rendimiento. Para prevenir esto, (Dong, 2012) propuso el uso de soluciones de N,N-dimetil formamida (DMF) y metanol para la activación de membranas ZIF-78 para disminuir la velocidad de difusión de la DMF. En especial sugiere inicial la activación sumergiendo las

membranas en la solución N,N-dimetil formamida-metanol con una baja composición de metanol con la finalidad de reducir la concentración de gradiente de la DMF (Melgar-Aceituno, 2015).

## **5.2 Clasificación de la síntesis de membranas ZIF**

### **5.2.1 Crecimiento *in situ***

El crecimiento *in situ* comprende el crecimiento de una membrana ZIF en un soporte poroso el cual no contiene ningún cristal adjunto a sus superficies. Esta técnica se logra sumergiendo el soporte en la solución precursora. Después de una cantidad suficiente de tiempo con una temperatura elevada, la nucleación comienza a realizarse y las ZIF comienzan a crecer en el soporte y la membrana es formada eventualmente. En este tipo de síntesis, la nucleación, el crecimiento y el crecimiento interno de los cristales ocurren al mismo tiempo durante un periodo largo de tiempo. El crecimiento *in situ* puede realizarse soportes modificados y no modificados (Melgar-Aceituno, 2015).

#### **5.2.1.1 Crecimiento *in situ* sobre soportes no modificados**

El crecimiento *in situ* de membranas ZIF sobre soportes no modificados resulta un reto debido a que la nucleación es difícil de lograr y la interacción de la membrana ZIF y el soporte es usualmente pobre. Para evitar esas complicaciones el calentamiento usando microondas se ha introducido con la finalidad de facilitar la nucleación y reducir el tiempo de síntesis a 4 horas o menos.

Especialmente el uso de microondas ha sido reportado en la síntesis de ZIF-8 sobre soportes de óxido de titanio usando metanol como solvente (Melgar-Aceituno, 2015).

#### **5.2.1.2 Crecimiento *in situ* sobre soportes modificados**

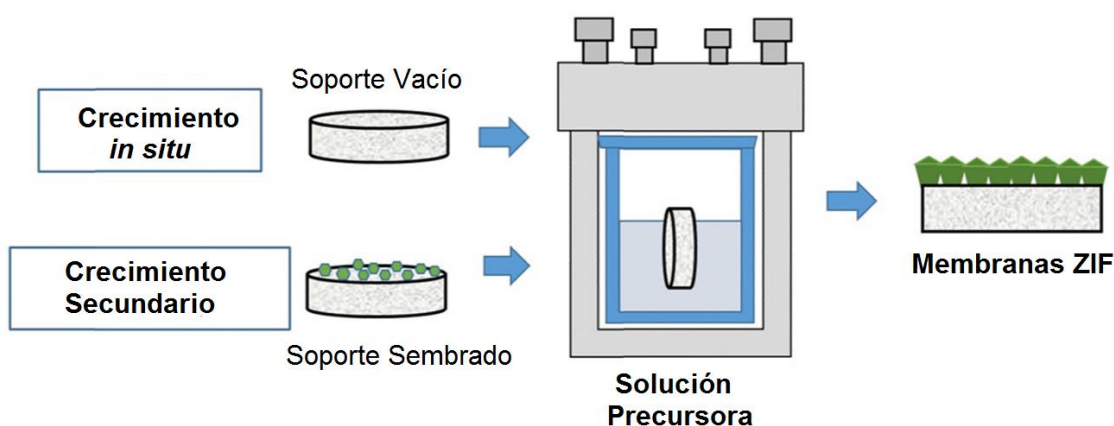
Dada la pobre interacción entre las membranas ZIF y los soportes, la modificación de la superficie es una alternativa como una manera de incrementar la nucleación heterogénea entre los cristales ZIF y el sustrato (soporte). Usualmente la superficie de los soportes es modificada con ligantes orgánicos.

La modificación de los soportes se realiza vertiendo gotas de una solución de metanol y el ligante orgánico sobre la superficie de los soportes de  $\alpha$ -alúmina y posteriormente se calientan a 200°C por 2 horas (Melgar-Aceituno, 2015).



### 5.2.2 Crecimiento Secundario.

El crecimiento secundario hace referencia a la síntesis de membranas ZIF en soportes que contienen algunos cristales previamente sembrados en los soportes. La mayoría de los cristales pueden ser ligados por tratamientos físicos o químicos. A diferencia de la síntesis *in situ* la nucleación de los cristales y el crecimiento interno no ocurren simultáneamente durante este método. Por otra parte, el crecimiento de la capa de cristales se realiza independientemente del soporte. Dependiendo del modo por el cual los cristales son ligados al soporte, este tipo de síntesis será clasificada como crecimiento secundario sobre soportes con cristales adjuntos vía química o física (Melgar-Aceituno, 2015).



**Fig. 7**  
*Esquema del proceso de síntesis de membranas ZIF por los métodos de crecimiento in situ y crecimiento secundario bajo condiciones solvotermal.* (Melgar-Aceituno, 2015).

### 5.3 Catalización de la transesterificación mediante el uso de membranas ZIF

La versatilidad estructural y las propiedades químicas de muchos materiales los convierten en candidatos en la búsqueda de nuevos materiales catalizadores. Además, a pesar de que en la actualidad existen miles de materiales estructurales en la base de datos de Cambridge (CSD) el número de publicaciones sobre su uso catalítico en reacciones es limitado y el uso de las MOFs continúa siendo un tema de estudio. (Ranocchiari, 2011)

La idea de usar MOFs en catálisis surge debido a que poseen algunas ventajas comparadas con las zeolitas minerales; por ejemplo, no requieren activación o regeneración a altas temperaturas y presentan áreas superficiales muy grandes. Recientemente, el uso de MOFs como catalizadores con características de ácidos de Lewis se ha explorado en la catálisis heterogénea y la reutilización del material ha sido posible conservando su actividad catalítica (Santiago, 2010).

La comparación con otros materiales porosos es de gran ayuda para predecir cuáles son las posibilidades en las aplicaciones catalíticas de las MOFs. De hecho, mientras se descubren más usos en las industrias han comenzado a utilizarse este tipo de materiales. A diferencia de las zeolitas, las MOFs proporcionan ciertas ventajas en cuanto al tamaño de los poros, debido a que en las MOFs no existe un límite teórico, existe la posibilidad de una distribución homogénea de los centros activos (Ranocchiari, 2011)

Tal como lo señala (Santiago, 2010) los centros metálicos presentes en las MOFs actúan como catalizadores ácidos que se comportan como ácidos de Lewis; (Gou, 2011) realizó un estudio en el cual se describe el papel como catalizador sólido heterogéneo de los ácidos de Lewis, usando como referencia  $Fe_2(SO_4)_3$ , el cual actúa como un aceptor de electrones a través de la formación de un estado de transición en forma de un anillo de cuatro miembros. Los triglicéridos que se encuentran en la reacción y el metal forman un complejo de Lewis, el cual ayuda a los ácidos sólidos de Lewis durante el proceso de activación de los grupos carbonilo para un ataque nucleofílico por parte del alcohol. El grupo carbonilo coordina un sitio vacío en la especie activa catalítica.

Adicionalmente en el estudio de (Gou, 2011) se probaron metales como: Ca, Ba, Mg, Cd, Mn, Pb, Zn, Co y Ni catalizando la reacción de transesterificación en presencia de metanol en donde los mejores resultados se reportaron después de 200 min de reacción.

Los sitios ácido-base de Lewis tienen la habilidad para catalizar la transesterificación de aceites, junto a un área específica en la superficie, tamaño y volumen de poro, la concentración de los sitios activos y el tipo de acidez son factores importantes para el desempeño de los ácidos sólidos.

Recurrentemente la catálisis homogénea es un método predominante para la reacción de transesterificación. La separación del catalizador de la mezcla de los reactivos y los productos resulta técnicamente difícil. A comparación con los catalizadores ácidos líquidos, los catalizadores ácidos sólidos tienen ventajas como su reciclaje, separación y además son amigables con el medio ambiente (Gou, 2011).

En todas las MOFs y por consiguiente en las ZIFs existen tres partes diferentes que se pueden diferenciar claramente: el componente metálico, el ligante orgánico y el sistema de poros. Por este motivo se puede pensar en tres tipos de catálisis distinta basada en las características de las membranas y del uso de las mismas (Corma, 2010).

La actividad catalítica observada por estos materiales está directamente relacionada a sus componentes metálicos, ya sea como centros metálicos aislados o como grupos (dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.), cadenas u hojas conectados mediante los ligandos orgánicos. Las membranas de este grupo incluyen materiales

con un solo tipo de centros metálicos, los cuales actúan simultáneamente como un componente de construcción estructural y un sitio catalítico activo (Corma, 2010).

La catálisis por iones metálicos es un método muy eficiente de acelerar reacciones orgánicas que se encuentran en soluciones. Se ha demostrado esta eficiencia en numerosas cantidades de reacciones orgánicas, incluida la hidrólisis de ácidos carboxílicos, amidas e incluso reacciones de carboxilación y descarboxilación. (Bender, 1962) En la actualidad se ha descrito su uso como catalizador en la producción de biodiesel.

## **HIPOTESIS.**

- El cultivo de la microalga *Scenedesmus obliquus* en condiciones de estrés como lo es la limitación de nutrientes específicos (N y F) y a una temperatura mayor a 30°C propicia el crecimiento acelerado de biomasa.
- El uso de las membranas ZIF 7 favorece la reacción de transesterificación de ácidos grasos de la microalga, debido a la actividad catalítica de los iones metálicos presentes en su estructura.

## **OBJETIVOS**

### **General:**

- Obtención de biodiesel a partir de los ácidos grasos de microalga *Scenedesmus obliquus* implementando la membrana ZIF 7 como catalizador de la reacción.

### **Particulares:**

- Obtención de cultivos escalados de *Scenedesmus obliquus* (200 mL, 6L y 15 L)
- Inducción de estrés mediante parámetros físicos y químicos.
- Elaboración y funcionalización de membranas ZIF 7.
- Análisis de los ésteres metílicos obtenidos por métodos analíticos.

## CAPÍTULO VI. Metodología del cultivo, Recolección de biomasa y extracción de lípidos intracelulares de *Scenedesmus obliquus*

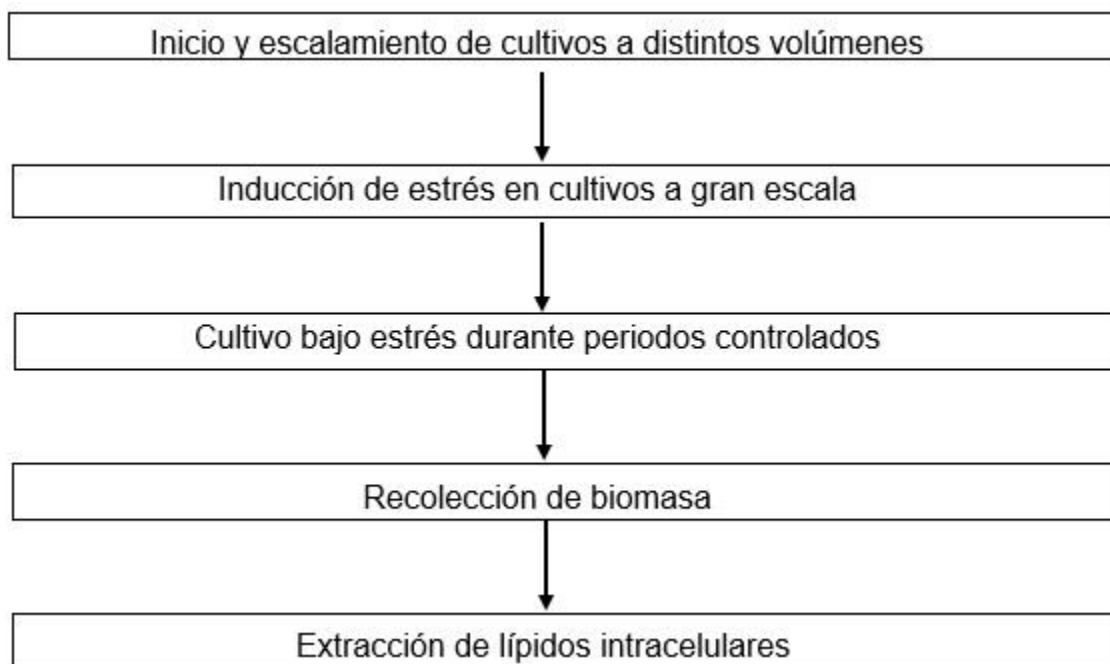
### Objetivo:

Cultivar bajo estrés a gran escala la cepa de microalga *Scenedesmus obliquus* (limitación de nutrientes específicos (Nitrógeno y Fósforo) e inducción del crecimiento celular a temperaturas que sobrepasan el promedio (30°C)) durante un periodo de tiempo controlado con la finalidad de aumentar la producción y mejorar el perfil de los lípidos intracelulares. Así como la recolección de biomasa y extracción de lípidos celulares.

### 6.1 Escalamiento, cultivo, recolección de biomasa de *Scenedesmus obliquus* y extracción de lípidos celulares

A continuación, se describirán los pasos para obtener cultivos óptimos para la elaboración de biodiesel usando como materia prima el aceite de microalgas. Proceso que consta del escalamiento de los cultivos iniciando por volúmenes de 250 mL y 6L a nivel laboratorio y posteriormente a 15L en estanques abiertos. En los cuales se inducirán las condiciones de estrés. Además de la recolección de biomasa y la extracción de lípidos.

En la siguiente figura se presenta un diagrama de flujo en donde se muestran las etapas que componen el escalamiento, cultivo, recolección de biomasa y extracción de lípidos de la biomasa.



**Fig. 8**  
*Diagrama de flujo de la experimentación en el crecimiento de la microalga.*

### 6.1.2 Medios de Cultivo

- Medio Bold Basal modificado (liquido 50x Sigma-Aldrich)
- Fertilizante Inorgánico Foliar Bayfolan Forte (liquido marca Bayer®) (Nitrógeno: 11.470, Fósforo ( $P_2O_5$ ): 8.000 % en peso/peso)

### 6.1.3 Materiales

- Matraces de 250mL, 500mL y 1L
- Pipetas graduadas 1-10mL
- Tiras de papel pH
- Focos de luz fría 100 Watts.
- Contenedores de cristal rectangulares 15L
- Tubos de ensayo

### 6.1.6 Solventes

- Hexano
- Etanol

### 6.1.5 Equipos

- Bomba sumergible de flujo continuo (capacidad: 280L/Hr.)
- Bomba de aire elite (capacidad: 57L/Hr.)
- Centrifuga

## 6.2 Cultivo de *Scenedesmus obliquus*

La cepa de microalga *Scenedesmus obliquus* fue adquirida en el laboratorio de Algas continentales. Ecología y Taxonomía del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Para iniciar el cultivo se añadió una alícuota de 5mL de la cepa (en la cual se determinó una población de 85,000 cel./mL equivalente a 0.50gr de biomasa) en 4 matraces de 200 mL con medio de cultivo fresco Bold Basal modificado marca Sigma Aldrich.

El cultivo fue mantenido a 25°C, pH 7, 2000-3000 luxes de iluminación, fotoperiodos 12hrs. de luz y 12hrs. de oscuridad y agitación diaria con bombas de aire durante 25 días, posteriormente la biomasa fue trasladada a 14 recipientes de 6L de capacidad durante 25 días más, bajo las mismas condiciones.

Al cabo de los 25 días de cultivo la biomasa total de los 14 recipientes fue trasladada a 5 contenedores de 15 L en donde el crecimiento se realizó de forma mixotrófico y para el cual el medio bold basal modificado fue sustituido por el fertilizante inorgánico foliar bayfoland forte de la marca Bayer (Nitrógeno: 11.470, Fósforo ( $P_2O_5$ ): 8.000 % en peso/peso) como fuente de nutrimentos, suministración de  $CO_2$  proveniente del ambiente, pH 7, iluminación natural solar y 35°C de

temperatura. Los cultivos a gran escala se realizaron en estanques abiertos circulados por bombas de flujo continuo en un invernadero con la finalidad de mantener condiciones similares a los climas tropicales en donde las microalgas suelen desarrollarse durante 17 días de cultivo.

Para la limitación de Nitrógeno y Fósforo el cultivo se mantuvo durante 14 días más en las condiciones mixotróficas pero sin añadir más medio nutritivo.

### 6.2.1 Calculo de producción de biomasa total

Durante el escalamiento y al finalizar el crecimiento de los cultivos se calculó producción de biomasa total. Este paso es importante para contabilizar la cantidad de biomasa formada con relación al volumen del cultivo. Este procedimiento se realizó eligiendo un contenedor de modo aleatorio en cada una de las tres etapas de crecimiento por duplicado en cada caso. Para recolectar la biomasa por completo se centrifugó a 4500 r/min. durante 15 min. El sobrenadante de agua fue eliminado y la biomasa depositada en una bandeja y pesada en una balanza analítica. Las ecuaciones utilizadas para este caso fueron las siguientes. De igual forma se realizaron los cálculos para determinar el peso de biomasa seca y húmeda.

$$1. BH = P_1 - P_2$$

$$2. BS = P_3 - P_4$$

$$3. PBH = \frac{BH}{V}$$

$$4. PBS = \frac{BS}{V}$$

$$5. C = \frac{(BS*100)}{BH}$$

En donde BH es la biomasa húmeda en gramos,  $P_1$  peso de la biomasa húmeda recolectada,  $P_2$  el peso de la bandeja usada, BS la biomasa seca,  $P_3$  el peso de la biomasa seca,  $P_4$  el peso de la bandeja.

Para calcular la productividad de la biomasa seca y húmeda se dividió el peso de la biomasa sobre el volumen del cultivo. Mientras que para calcular el porcentaje de conversión de biomasa húmeda a seca se utilizó la ecuación 5

## 6.2.2 Ubicación del cultivo

Los cultivos a gran escala se ubicaron en un invernadero que se construyó en la parte superior del edificio C de la facultad de ciencias, ubicada en el campus “el cerrillo” en la localidad de El cerrillo Piedras blancas, Toluca.

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca está situado a 2,600 metros de altitud sobre el nivel del mar, sus coordenadas geográficas son latitud norte 19° 24' 48”, longitud oeste 99° 40' 45”. La presión atmosférica en dicho lugar es de 560 mmHg.

En la siguiente tabla se muestra la temperatura en el municipio de Toluca y en especial en El cerrillo piedras blancas. (ver tabla 8.)

Mes	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Oct.	Nov.	Dic.
Temperatura Min. (°C)	-1.7	-0.6	2.0	3.1	5.2	7.0	6.1	6.2	5.4	1.9	-0.7	-0.4
Temperatura media (°C)	10.2	12.1	14.6	15.4	16.45	16.85	14.75	14	14	12.45	10.5	9.8
Temperatura Máx. (°C)	22.1	24.8	27.6	27.7	27.7	26.7	23.4	21.8	22.6	23.0	21.7	20.0

*Tabla 8*

*Servicio Meteorológico Nacional, Normales Climatológicas Mensuales 1991-2015* (Nacional, 2015)

Según datos del INEGI el clima de Toluca y Cerrillo Piedras Blancas es considerado templado sub-húmedo con lluvias en verano. De acuerdo al Servicio Meteorológico Nacional, la precipitación media anual en la ciudad de Toluca es de 760-800 mm mostrando mayor cantidad de cuerpos de agua durante los meses de Junio a Septiembre y la humedad relativa anual es de 60- 65 %. (Nacional, 2015)

## 6.3 Recolección y Secado de biomasa de *Scenedesmus obliquus*

Una vez transcurridos los 17 días de cultivo la biomasa fue recolectada dejándola sedimentar y por centrifugación a 4,000 revoluciones por segundo con la finalidad de recolectar la mayor cantidad posible.

La biomasa total recolectada fue colocada en recipientes de vidrio para ser deshidratados a 50°C durante tres días en una estufa de calentamiento para no dañar la estructura de la célula ni la composición de los ácidos grasos.

Una vez deshidratada la biomasa fue triturada con un mortero de porcelana para homogenizarla y guardada en bolsas selladas para su futuro uso.

El secado total de la biomasa es un paso importante para la posterior extracción de los lípidos intracelulares, debido a que la ausencia de agua facilita la extracción de estos mediante el uso de solventes.

#### **6.4 Extracción de lípidos celulares**

Para la extracción de los lípidos intracelulares se pesaron 15 gramos de biomasa seca y se disolvió en 50 mL de una solución de Hexano-Etanol a una concentración 1:1. Posteriormente la disolución de biomasa y solventes fue sometida a un baño de sonicación en un equipo BRANSON a una intensidad de 40kHz durante 45 min. Y después de la sonicación la biomasa se agitó durante una 1 hora para facilitar la salida de los lípidos. Para separar la fase acuosa de la materia orgánica la preparación fue centrifugada a 2,000 revoluciones por minuto durante 20 min. Con una pipeta Pasteur se recuperó la fase líquida en donde se encuentran los lípidos de la microalga y se almacenó en frascos color ámbar.



## CAPÍTULO VII. Metodología de producción del biodiesel

### Objetivo:

Desarrollar un sistema continuo de biodiesel usando aceite de microalgas mediante el uso de membranas catalíticas reutilizando el catalizador.

### 7.1 Proceso de elaboración del biodiesel

En este capítulo se detallará la técnica para elaborar el biodiesel usando como materia prima el aceite de microalga empleando la membrana ZIF 7 como catalizador y el procedimiento de elaboración de dicha membrana.

En la siguiente figura se muestra el diagrama de flujo que muestra las diferentes etapas que conforman esta metodología.



**Fig. 9**  
*Diagrama de flujo de la producción del biodiesel.*

#### 7.1.1 Reactivos empleados

- Aceite de microalga *Scenedesmus obliquus*
- Agua destilada
- Óxido de aluminio  $Al_2O_3$  (99.9% pureza, marca Alfa Aesar)
- Benzimidazol (98% pureza, Sigma Aldrich)

- Formiato de Sodio  $COONa$  (bioultra 99% pureza, Aldrich)
- Metanol  $CH_3OH$  (98% pureza, J.T. Baker)
- Nitrato de Zinc hexahidratado  $N_2O_6Zn6H_2O$  (98% pureza, Sigma Aldrich)
- N,N-Dimetilformamida (99% pureza, Sigma Aldrich)
- Cloroformo deuterado ( $CDCl_3$ ) (99.8% pureza, Sigma Aldrich)
- Hexano ( $C_6H_{14}$ ) (98.7% pureza, Fermont)

### 7.1.2 Materiales

- Vasos de precipitados de 250 mL
- Crisol de porcelana
- Pipeta Pasteur
- Agitador magnético
- Espátulas
- Embudo de separación
- Pipeta volumétrica
- Termómetro
- Tubos de ensayo
- Frascos de vidrio color ámbar

### 7.1.3 Equipos

- Balanza analítica
- Parrilla de calentamiento con agitación
- Autoclave
- Sonificador
- Mufla de calentamiento
- Celda térmica
- Controlador de temperatura
- Microscopio electrónico de barrido
- Difractómetro de rayos x de polvos

## 7.2 Preparación de soportes de $\alpha$ -alúmina

Para preparar los soportes de alúmina se pesan 10 gr del reactivo en el crisol de porcelana y se le agrega 1mL de agua destilada, se mezcla hasta eliminar grumos y tener una consistencia fina.

Posteriormente 2gr de la alúmina preparada se colocan en los dados o “holder” y se presionan en una prensa hidráulica a 10 toneladas durante 1 minuto para formar los soportes.

Una vez formados los soportes se calcinan en una mufla de calentamiento a 900°C durante 12 horas y posteriormente un segundo calentamiento a 1100°C durante 2 horas. Después de este tiempo se deja enfriar lentamente 1°C/min

aproximadamente, para después hidratar el soporte con menos de 0.5 mL de agua, con el objetivo de fortalecer los enlaces de OH, formados en el soporte.

Al finalizar este procedimiento, se toma la superficie más lisa del soporte y se lija hasta dejar la superficie lisa, se sónica en agua y se seca en la estufa con la final de obtener una superficie homogénea lista para usarse.

### 7.3 Síntesis de la membrana catalítica ZIF-7

Los soportes de  $\alpha$ -alúmina se colocan previamente en una estufa de calentamiento a 200°C durante 30 min. Y durante este tiempo se procede a preparar la solución de ligante con la finalidad de que los cristales vayan depositándose en la superficie del soporte.

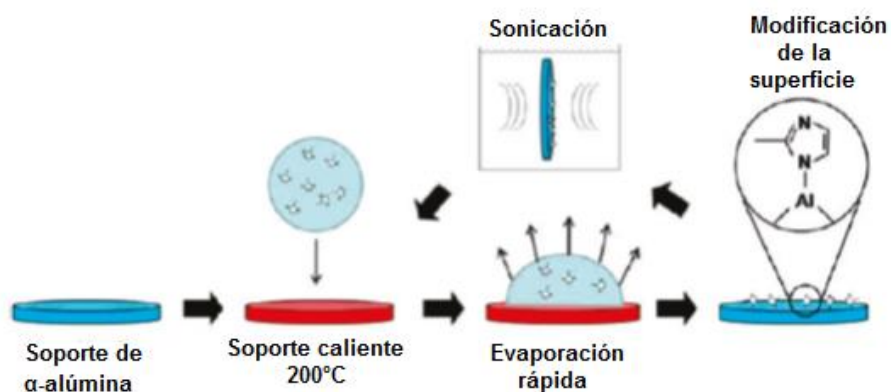
Las membranas ZIF-7 usan como ligante el benzimidazol del cual se pesan 3.68 y se disuelven en 50 mL de metanol, se agita y se mantiene a temperatura ambiente.

Una vez que transcurrieron los 30 min. y los soportes se han calentado se vacía con la ayuda de una pipeta Pasteur de 0.5 a 1.0 mL de la solución precursora de ligante cubriendo la totalidad de la superficie del soporte sin sacar el soporte de la estufa, después se deja secando durante 15 min.

Se sacan los soportes de la estufa y se sonicán en metanol 10-20 segundos aproximadamente, con el fin de que el material del ligante que no se haya adherido al soporte se desprenda.

Se colocan los soportes de nuevo a la estufa para que los soportes se sequen y se vuelve a repetir el procedimiento al menos seis veces o hasta que la superficie del soporte exhiba un cambio de coloración a café-oscuro.

La siguiente figura ilustra este procedimiento en el que la solución precursora inicia el crecimiento de los cristales.



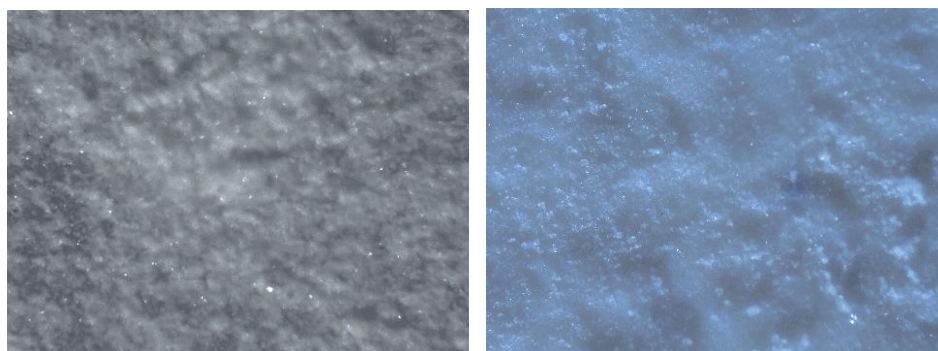
**Fig. 10**  
**Crecimiento de cristales en el soporte.** (McCarthy, 2010)

Para el crecimiento de los cristales ZIF-7 se prepara una solución de 1.53 gr de Nitrato de Zinc hexahidratado ( $N_2O_6Zn6H_2O$ ), 0.81 gr de benzimidazol y 0.70 gr de formiato de sodio disueltos en 40 mL de N,N-Dimetilformamida. La preparación se agita y se mantiene a temperatura ambiente.

Una vez preparada la solución precursora de cristales, el soporte modificado con ligante se coloca en la autoclave de teflón con capacidad de 45 mL a 45° con respecto a la superficie del recipiente y de la superficie del soporte, se vacía la solución precursora.

La autoclave se lleva a la estufa a 120°C durante tres horas. Una vez trascurrido este tiempo la autoclave se retira de la estufa y se deja enfriar gradualmente a temperatura ambiente. Cuando el soporte se enfría se sónica quitar los soportes que no se adhirieron correctamente al soporte. A simple vista es posible observar un brillo sobre la superficie debido a los cristales que forman la membrana.

En las siguientes figuras se muestra la membrana cristalina sobre cubreobjetos y ya anclada al soporte de óxido de aluminio respectivamente observadas en el microscopio óptico. (ver fig. 12a y 12b)



*Fig. 11a*

*Fig. 11b*

*Membranas catalíticas ZIF 7*

### **7.3.1 Análisis SEM**

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características.

Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales. Las principales utilidades del SEM son la alta resolución ( $\sim 100 \text{ \AA}$ ), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras.

La muestra debe estar seca, y se corta un pequeño pedazo del soporte que contiene los ZIF-7, en un porta muestra para el SEM se le coloca cinta adhesiva de carbón y se manipula la muestra adhiriéndola a la cinta, se introduce en una bolsa cubriéndola de la humedad para así mandarla al análisis del SEM. (Montesinos, 2013).

#### 7.4 Difracción de rayos X

La difracción de rayos x es una técnica experimental para el estudio y análisis de materiales basado en el fenómeno de la difracción de rayos x por sólidos en estado cristalino.

La difracción de rayos en muestra policristalina permite abordar la identificación de fases cristalinas (puesto que todos los sólidos cristalinos poseen su difractograma característico) tanto en su aspecto cualitativo como cuantitativo

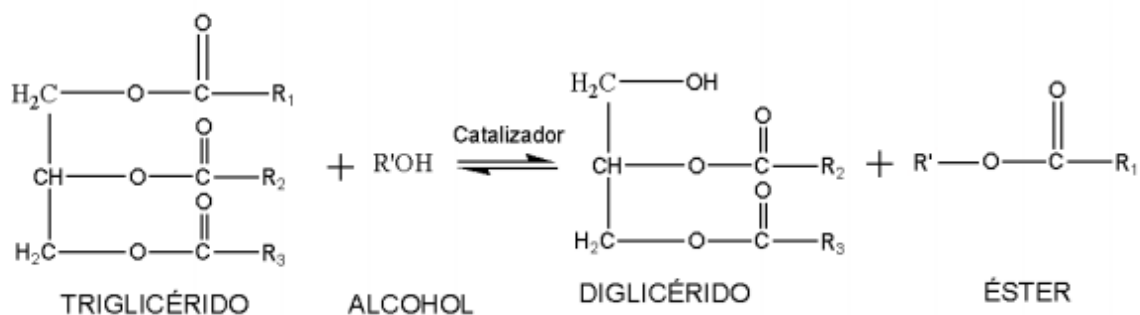
El soporte con el catalizador ZIF 7 se coloca dentro del difractómetro y se analiza con la finalidad de encontrar los picos característicos de los cristales ZIF 7.

#### 7.5 Reacción de transesterificación.

El proceso continuo inicia con la preparación de los reactivos (etanol y aceite) los cuales se ingresan mediante la corriente de alimentación, posteriormente pasan a través de la membrana catalítica la cual se encuentra en la celda térmica, en esta etapa se lleva a cabo la reacción por medio del contacto de los reactivos con los cristales del catalizador y a través de los poros de la membrana y del soporte. Durante la reacción los parámetros son los siguientes:

<b>Temperatura</b>	<b>60°C</b>
<b>Presión Atmosférica de Toluca</b>	<b>558 mmHg</b>

A continuación, se muestra la instalación empleada para realizar la reacción de transesterificación representada en la figura 13, donde se puede observar el proceso continuo a través de la membrana catalítica.





- **Controlador de temperatura**

El controlador de temperatura es un dispositivo en el cual se programa la temperatura deseada para la celda, permite monitorear la temperatura de la reacción mediante un sensor térmico.

## **7.6 Caracterización del producto obtenido**

El biodiesel obtenido fue analizado mediante la técnica analítica de NMR (resonancia magnética nuclear por sus siglas en inglés). Mediante esta técnica se mide el porcentaje de conversión y permite corroborar la existencia del biodiesel con el espectro obtenido.

### **7.6.1 Análisis por NMR**

La resonancia magnética nuclear (RMN) es el método espectroscópico más poderoso y utilizado para la determinación de la estructura molecular en disolución.

En muchos casos da información sobre la forma y simetría con un grado de precisión mayor que otras técnicas como la espectroscopia infrarroja. La RMN se observa en compuestos que contengan elementos con núcleos magnéticos (aquellos cuyo espín nuclear sea distinto de cero). La sensibilidad depende de varios parámetros, entre ellos la abundancia del isótopo y la magnitud de su movimiento magnético nuclear.

Por ejemplo, el  $^1\text{H}$  con una abundancia natural de 99.98% y un momento magnético grande es más fácil de observar que el  $^{13}\text{C}$ , que tiene un momento magnético menor y una abundancia de 1.1% (Sharma, 2009)

Para preparar la muestra se agregó 0.25 mL del producto obtenido y se disolvió en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) dentro de un tubo para resonancia magnética. El experimento utilizado para esta muestra fue  $^1\text{H}$  a 300 MHz.

## CAPÍTULO VIII. Resultados y Discusiones

### 8.1 Producción de biomasa total

Como se mencionó en el capítulo VI, el cálculo de la biomasa producida en un cultivo de microorganismos es esencial para comprender la productividad de biomasa con relación al volumen de los cultivos. En las siguientes tablas se muestra la biomasa húmeda y seca total producida durante las tres etapas de cultivo de contenedores tomados de forma aleatoria por duplicado. Las bandejas utilizadas para transportar la biomasa y pesarla tienen un peso de 250.69 gr. (ver tablas 9, 10 y 11) Se aprecia en las tablas que la producción de biomasa es mayor durante el crecimiento en condiciones de estrés de temperatura correspondiente a la tercera etapa de crecimiento en invernadero.

#### Etapa 1

Contenedor No.	Biomasa húmeda recolectada	Biomasa seca recolectada	Volumen (L)	Porcentaje de conversión de biomasa (%)	Productividad Biomasa seca gr/L
1	2.0	1.35	0.25	67.5	5.4
2	2.6	1.56	0.25	60.0	9.73

Tabla 9.

*Producción de biomasa durante los primeros 25 días.*

#### Etapa 2

Contenedor No.	Biomasa húmeda recolectada (gr/L)	Biomasa seca recolectada (gr)	Volumen (L)	Porcentaje de conversión de biomasa (%)	Productividad Biomasa seca gr/L
1	12.0	11.02	6	67.5	1.83
2	15.36	13.20	6	60.0	2.2

Tabla 10.

*Producción de biomasa durante el segundo crecimiento de 25 días.*

#### Etapa 3

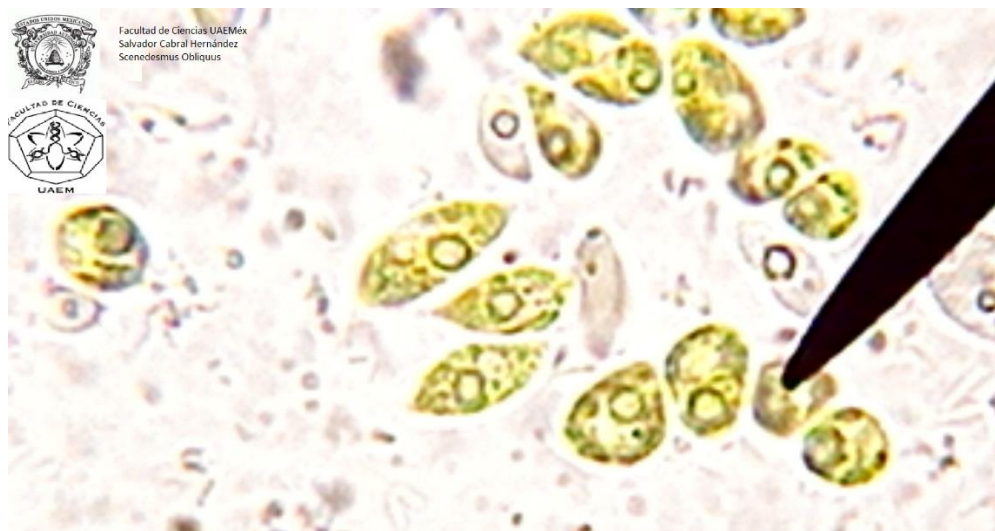
Contenedor No.	Biomasa húmeda recolectada (gr/L)	Biomasa seca recolectada (gr)	Volumen (L)	Porcentaje de conversión de biomasa (%)	Productividad Biomasa seca gr/L
1	550	425	15	77.27	28.33
2	365	315	15	86.30	21.0

Tabla 11.

*Producción de biomasa en condiciones mixotróficas bajo estrés en invernadero 17 días.*



En la figura 14 se muestra una imagen de la microalga *Scenedesmus obliquus* en la que se puede apreciar que la célula se encuentra en solitario a diferencia de los cenobios que suele formar este género, como se menciona en el capítulo IV la razón radica en que las microalgas fueron sometidas a un estrés de temperatura. Se puede apreciar en las zonas transparentes la presencia de aceite en el interior de la microalga.

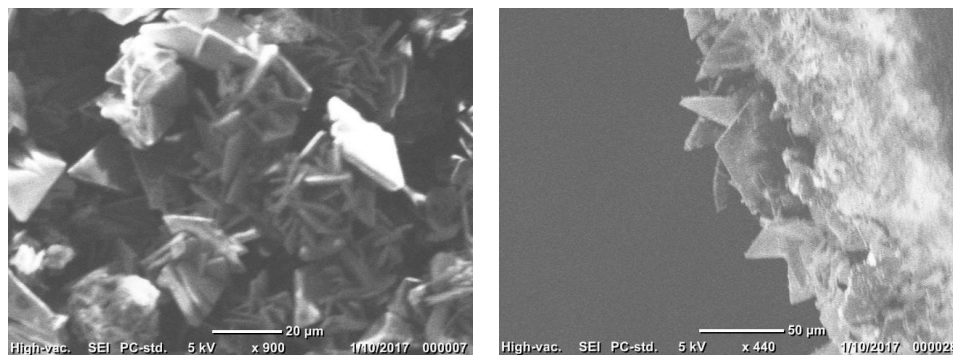


**Fig. 14**  
**Micrografía de *Scenedesmus obliquus* 40x,**  
**en donde se aprecia unicélulas con contenido de aceite en su interior**

## 8.2 Análisis del soporte

### 8.2.1 Análisis SEM

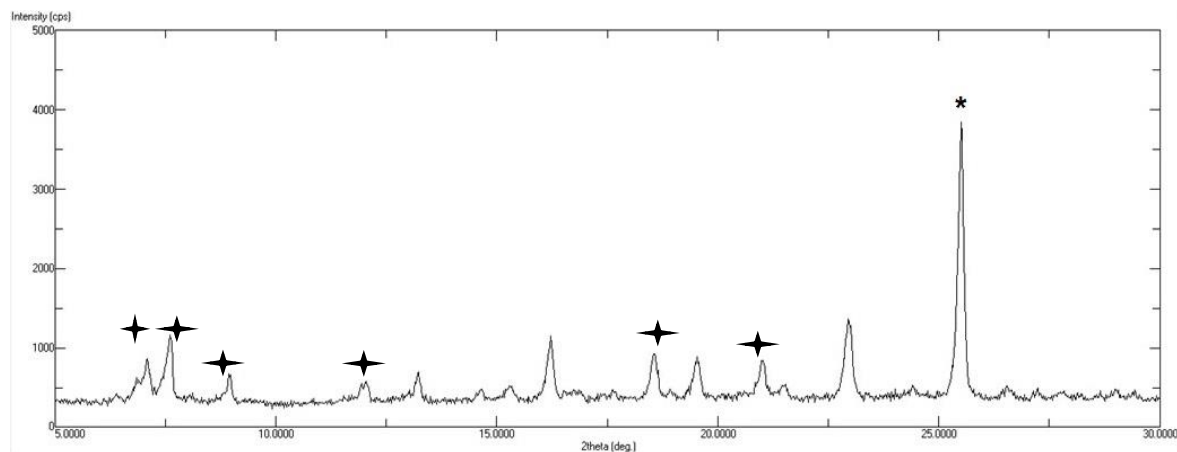
Con la microscopía electrónica de barrido podemos observar en la figura 15 la superficie (a) y la sección transversal del soporte de  $\alpha$ -alúmina con catalizador (b). En estas figuras se puede apreciar el orden de los cristales, su morfología y tamaño.



**Fig. 15**  
**(a) Superficie del soporte de alfa-alúmina con catalizador ZIF7**  
**(b) sección transversal del soporte de alúmina con catalizador ZIF7**

### 8.2.2 Difracción de rayos X.

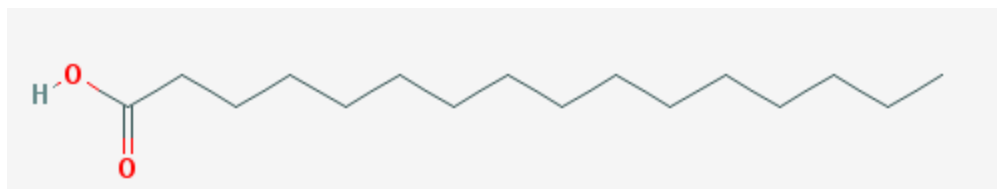
La fase cristalina de la membrana ZIF 7 fue identificada mediante la difracción de rayos X ubicando los picos característicos de los cristales ZIF 7 (+) y del soporte de alfa alúmina (\*) tomando como referencian a (Yan-Shuo, 2010) como se muestra a continuación en la figura 16.



**Fig. 16**  
**Difractograma de la membrana ZIF 7**  
**(\*) Pico del soporte de  $\alpha$ -alúmina (+) picos característicos del ZIF 7**

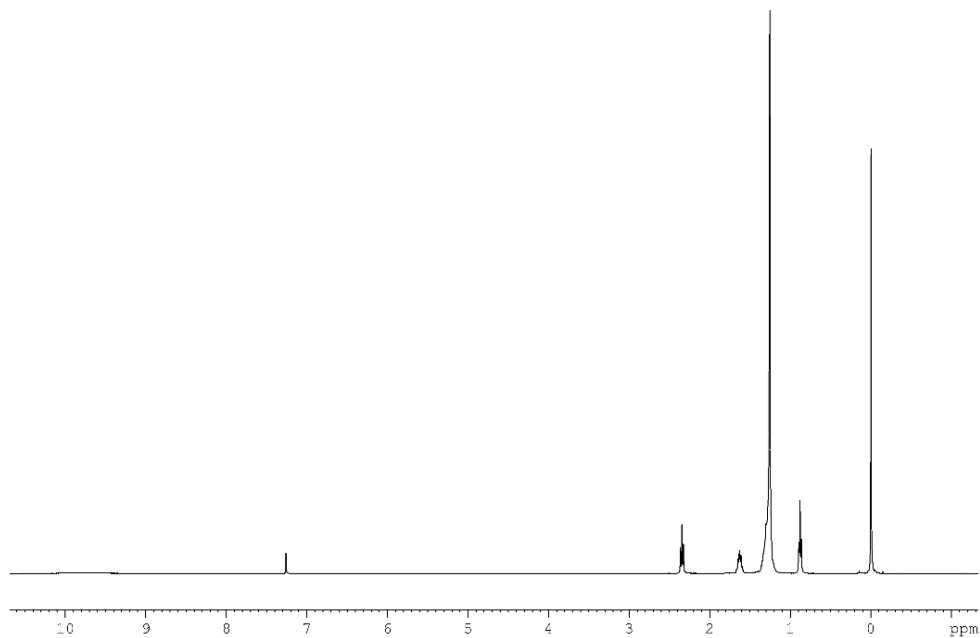
### 8.3 Espectros obtenidos por NMR

El aceite de la microalga *Scenedesmus obliquus* como se puede apreciar en la tabla 7 contiene 30.2% de ácido palmítico (C16:O) siendo el ácido graso más abundante, el cual tiene la siguiente fórmula química  $C_{16}H_{32}O_2$  y su estructura se presenta en la figura 17.



**Fig. 17**  
**Estructura del ácido palmítico**  
**Disponible en [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/palmitic\\_acid#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/palmitic_acid#section=Top)**

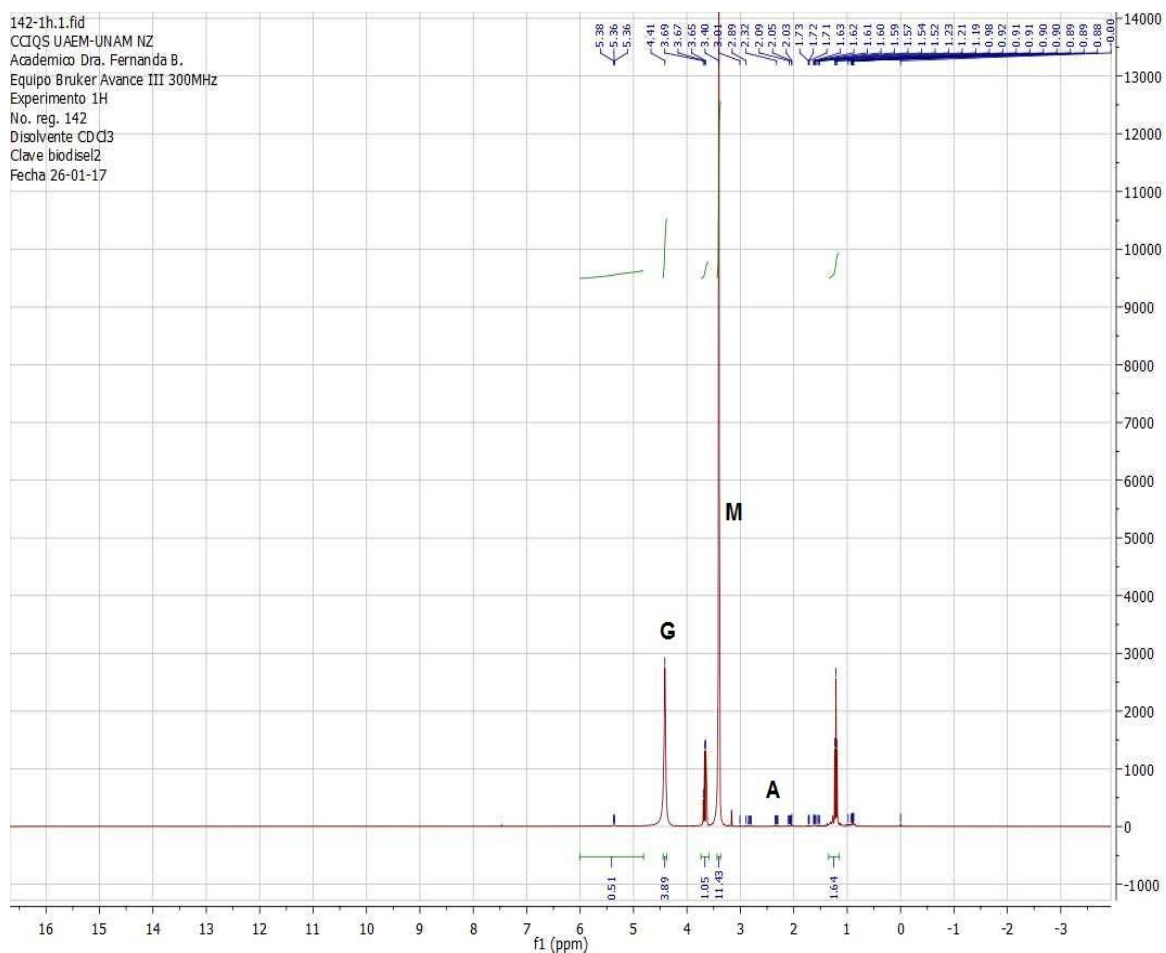
A continuación en la figura 18 se muestra el espectro del ácido palmítico usando el programa MestreNova.



**Fig. 18**  
**Espectro del ácido palmítico.**

## 8.4 Espectro de NMR del metil ester.

A continuación, se muestra el espectro de RMN del biodiesel obtenido del aceite de microalga utilizando el programa MestreNova.



**Fig. 19**  
**Espectro RMN del metil éster del biodiesel obtenido.**  
**La letra A, G y M denotan los átomos  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>, glicéricos y del metil éster respectivamente**

Con el espectro del MRN y el área bajo la curva de los picos obtenidos del biodiesel se puede aplicar la siguiente ecuación para calcular el porcentaje de conversión obtenida de la reacción de transesterificación. (Knothe, 2000). Incluso se puede observar que la señal en 3.4 muestra la presencia de metil éster.

$$C_{ME} = 100x \frac{5xI_{ME}}{5xI_{ME} + 9xI_{TAG}}$$

En donde  $C_{ME}$  representa la conversión del metil éster,  $I_{ME}$  es el valor de la integral del pico de metil éster y  $I_{TAG}$  corresponde al valor de la integral de los picos glicéricos en los triacilglicéridos (TAG) en el aceite.

Sustituyendo los valores de las integrales en la fórmula obtenemos lo siguiente:

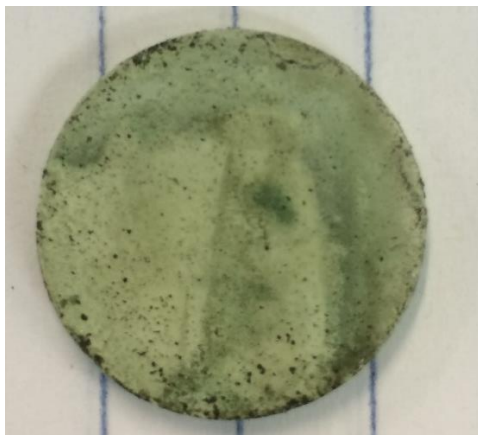
$I_{ME}$  Protones de metil éster – área 11.43

$I_{TAG}$  Protones de Glicerol en los triglicéridos – área 3.89

$$\%C_{ME} = 100x \frac{5x(11.43)}{5x(11.43) + 9x(3.89)}$$

$$\%C_{ME} = 62.01\%$$

En la figura 19 se puede apreciar el soporte con los cristales ZIF 7 después de la reacción de conversión. La membrana puede ser reutilizada para reacciones posteriores, para tal efecto será lavada en metanol para eliminar el exceso de ácidos grasos y limpiar los poros de la estructura cristalina.



**Fig. 20**  
**Soporte con cristales ZIF 7 después de la reacción de transesterificación.**

## CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES

El crecimiento de los cultivos de microalgas a nivel laboratorio y a gran escala en los estanques abiertos bajo condiciones de estrés resultaron exitosos toda vez que se logró incrementar la producción de biomasa exponiendo los cultivos a temperaturas superiores a los 30°C

Con los resultados obtenidos se asegura que es posible producir biodiesel en poco tiempo a partir del aceite de microalgas utilizando las membranas ZIF 7 como catalizador heterogéneo de la reacción obteniendo un 62.01% de conversión.

Con la implementación de estas membranas catalíticas ya no es necesario separar el catalizador del producto obtenido al final de la reacción de conversión, debido a que los cristales se encuentran anclados al soporte de  $\alpha$ -alúmina.

La ventaja que ofrece el uso de estas membranas sobre los catalizadores homogéneos, es que se pueden reutilizar lavándolas y quitando el exceso de ácidos grasos que no se convirtieron durante la reacción. Y esto se refleja en la disminución de costos de producción y en la generación de residuos químicos.

Para obtener un porcentaje mayor en la conversión es necesaria una metodología que permita la extracción total del aceite de microalga, y mediante esto, contar con una mayor disponibilidad de triglicéridos para su conversión; ya que se comprobó que la actividad catalítica no depende de la cantidad de catalizador, si no del tiempo de contacto con la superficie de la membrana.

La cantidad de catalizador depositado en la superficie de los soportes de  $\alpha$ -alúmina (aproximadamente 0.5 gr) es menor que el utilizado en sistemas tipo batch de producción de biodiesel.

Una vez comprobado que las membranas ZIF 7 catalizan la reacción de transesterificación de triglicéridos, se puede plantear la idea del uso de distintos iones metálicos como el Cobalto que ha mostrado mejores capacidades catalíticas que el Zinc.

Basados en los resultados obtenidos y analizando el porcentaje de conversión obtenido, se debe tomar en cuenta que este método de producción de biodiesel presenta muchas ventajas frente a los actuales, además de ser completamente sustentable y disminuir los precios en los costos de producción.

## Bibliografía

- Abdel-Hameed, M. (2007). Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Afr. J. Biotechnol*, 1181-91.
- Agency, E. P. (2002). A comprehensive analysis of biodiesel impacts on exhaust emissions. *EPA420-P-02-001*.
- Amin, S. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and management* 29, 1834-40.
- Armas, O. M.-M. (2011). Effect of an ethanol–biodiesel–diesel blend on a common rail injection system. *Fuel Processing Technology*.
- Aslan S, K. I. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 28, 64-70.
- Bala, B. (2005). Studies on biodiesels from transformation of vegetable oils for diesel engines. *Energy Edu Sci Technol* 15, 1-43.
- Balat M., B. H. (2008). A critical review of biodiesel as a vehicular fuel. *Energy Convers Manage* 49, 2727-41.
- Becker, E. (1994). *Microalgae. Biotechnology and Microbiology*. Great Britian: Cambridge University Press.
- Beer, L. B. (2009). Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Energy Biotech.* 20, 264-71.
- Bender, L. (1962). Metal Ion Catalysis of Nucleophilic Organic Reactions in Solution. *Advances in Chemistry; American Chemical Society*, 19-36.
- Bohnenberger, J. C. (2014). Influence of temperature and nutrient content on lipid production in freshwater microalgae cultures. *Academia Brasileira de Ciências.*, 699-730.
- Borowitzka, M. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70, 313-21.
- Canacki., M. (2008). Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35, 431-41.
- Carraretto C, M. A. (2004). Biodiesel as alternative fuel: Experimental analysis and energetic evaluations. *Energy*, 2195-2211.
- Cervantes, T. M. (2013). Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Biosource Technology* 130, 652–658.
- Chen, C. D. (1994). Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 109, 686-92.



- Chojnacka K., M.-R. F. (2004). Stoichiometric relationship of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology* 3, 21-34.
- Christie, W. (1989). *Gas Chromatography and Lipids - a Practical Guide*. Ayr, Escocia: The Oily Press.
- Corma, A. H. (2010). Engineering Metal Organic Frameworks for Heterogeneous Catalysis. *Chemical Rev.*, 4606–55.
- Darley, W. (1975). *Algal Biology: A Physiology of Giant Algal Cells*. London, UK: Cambridge University Press.
- Demirbas, A. (2002). Biodiesel fuels from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. *Energy Convers Mgmt* 44, 2349-56.
- Demirbas, A. (2008). *Biodiesel: A realistic fuel alternative for diesel engines*. Trabzon, Turkia: Springer.
- Dong, X. H. (2012). Synthesis of zeolitic imidazolate framework-78 molecular-sieve membrane; defect formation and elimination. *Journal of Materials Chemistry* 36, 19222-19227.
- Emerson, R. S. (1994). Relationships between phosphorylation and photosynthesis in *Chlorella*. *Am. J. Bot.* 31, 107-20.
- Energy, U. D. (2010). *Biodiesel Handling and Use Guide Fourth Edition*. National Renewable Energy Laboratory.
- Gao, K. W. (2007). Solar UV radiation drives CO<sub>2</sub> fixation in marine phytoplankton. *Plant Physiol.* 144, 54-59.
- Goering, C. S. (1982a). Fuel properties of eleven oils. *Trans ASAE* 25, 1472-1483.
- Goldman, J. A. (1982). The effect of pH in intensive microalgal cultures. *Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57, 1-13.
- Gou, F. F. (2011). Biodiesel Production with Solid Catalysts. En C. A. Sciences, *Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies* (págs. 339-358). China: InTech.
- Graboski, M. M. (1998). Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. *Prog Energy Combust Sci* 24, 125-64.
- Graham, E. W. (2000). Algae. En E. W. Graham, *Algae* (págs. 468-469). Wisconsin- Madison: Prentice Hall.
- Guckert, J. C. (1990). Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* during high pH induced cell cycle inhibition. *Journal of Phycology* 26, 72-79.
- Guiry, M. G. (Abril de 2015). *AlgaeBase*. Obtenido de AlgaeBase: <http://www.algaebase.org>
- Han, F. H. (2016). Effect of high temperatures stress on microalgae at the end of the logarithmic phase for the efficient production of lipid. *Environmental Technology*, 1-31.
- Harris, G. (1986). *Phytoplankton Ecology: Structure, Function*. New York: Chapman and Hall.

- Harwood, J. G. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45, 160-86.
- Hatschek, E. (1968). *The viscosity of liquids*. New York: D. Van Nostrand company.
- Hegewald, E. (1997). Taxonomy and Phylogeny of Scenedesmus. *The Korean Journal of Phycology* 12, 235-46.
- Hernandez, J. D.-B. (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Microb. Technol.* 38, 190-98.
- Hu, Q. (2006). PSA abstracts. *J. Phycol* 42, 1-48.
- Hu, Q. S. (2008). Microalgatriacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal* 54, 621-39.
- INEGI. (27 de Septiembre de 2016). *inegi.org.mx*. Obtenido de <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/petroleo/default.aspx?tema=S>
- Information, N. C. (18 de enero de 2017). *PubChem Open Chemistry Database*. Obtenido de [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/palmitic\\_acid#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/palmitic_acid#section=Top)
- Islam, M. B. (2004). The fuel properties of pyrolysis liquid derived from urban solid wastes in Bangladesh. *Biosource Technol* 92, 181-186.
- Jimenez C, C. B. (2003). Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: A predictive model of algal yield. *Aquaculture* 221, 331-45.
- Juneja, A. C. (2013). Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* 6, 4607-38.
- Knothe, G. (2000). Monitoring a Progressing Transesterification Reaction by Fiber-Optic Color Near Infrared Spectroscopy with Correlation to <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *ARS, USDA, NCAUR. University St., Peoria. JAOCS* 5, 158-65.
- Krawczyk, T. (1996). Biodiesel - Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *INFORM* 7, 801-829.
- Laforgia, D. A. (1994). Biodiesel fuelled IDI engines: performances, emissions and heat release investigation. *Bioresour Technol* 51, 53-59.
- Li Y, H. M. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress* 81, 815-20.
- Lüring, M. (1999). The Smell of Water: Grazer-Induced Colony Formation in *Scenedesmus*. Thesis. Agricultural University of Wageningen.
- Mata M.T., M. A. (2009). Microalgae for biodiesel production and other applications; A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 218-30.

- McCarthy, M. V.-G. (2010). Synthesis of Zeolitic Imidazolate Framework Films and Membranes with Controlled Microstructures. *Langmuir Article 26*, 14636-41.
- Meher. L.C, D. S. (2010). Technical aspects of biodiesel production by transesterification a review. *Renewable and sustainable energy reviews 10*, 248-268.
- Melgar-Aceituno, V. K. (2015). Zeolitic imidazolate frameworks membranes for gas separation: A review of synthesis methods and gas separation performance. *Journal Of Industrial And Engineering Chemistry 28*, 1-15.
- Moheimani N.R. (2006). The Culture of Coccolithophore *Pleurochrysis carterae* in outdoor raceway pounds. *Journal of Applied Phycology 18*, 703-12.
- Montesinos, M. (2013). Aplicaciones de microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de la fractura de una aleación. Obtenido de <http://cabierta.uchile.cl/revista/28/articulos/pdf/edu3.pdf>
- Muñoz, R. G. (2006). Algal-bacteria processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res. 40*, 2799-815.
- Murphy, D. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research 40*, 325-438.
- Nacional, S. M. (Enero de 2015). *Comisión Nacional del Agua*. Obtenido de [http://smn1.conagua.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=42&Itemid=75](http://smn1.conagua.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=42&Itemid=75)
- Otsuka, H. (1961). Changes of lipid and carbohydrate contents of *Chorella* y *Chlamydomonas* cells during the sulfur starvation, as studied by the technique of synchronous culture. *J. Gen. Appl. Microbiol. 7*, 72-77.
- Parent, L. T. (1991). Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr. 36*, 1555-1577.
- Pimentel, B. P. (2014). Zeolitic Imidazolate Frameworks: Next-Generation Materials for Energy Gas Separations. *Chem. Pub. Soc. Europe 7*, 1-40.
- Pratas, M. F. (2011). Biodiesel Density: Experimental Measurements and Prediction Models. *Energy Fuels*, 2333-40.
- Pruder, G. B. (1979). The Role of CO<sub>2</sub> enrichment of aerating gas in the growth of an estuarine diatom. *Aquaculture 17*, 1-15.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: productio systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol 57*, 287-93.
- Pulz, O. (2007). Evaluation of greenfuel's 3D matrix algal growth engineering scale unit: APS Red Hawk Unit AZ. *Instit. fur Getreidevararbeitung GmbH.*, [www.greenfuelonline.com](http://www.greenfuelonline.com).
- Rajakumari, S. G. (2008). Syntesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Progress in Lipid Research 47*, 157-71.

- Rakopoulos D.C., K. E. (2008). Effects of ethanol-diesel blends on the performance and exhaust emissions of heavy duty DI diesel engine. *Energy Convers Manage* 49, 3155-3162.
- RAMA. (15 de Diciembre de 2016). *Edo.Mex.gob.mx*. Obtenido de <http://rama.edomex.gob.mx/calidad-aire/reporte-mensual/2016>
- Ranocchiari, M. A. (2011). Catalysis by metal–organic frameworks: fundamentals and opportunities. *Physical Chemistry Chemical Physics* 13, 6373-6718-2.
- Raven, J. G. (1988). Temperature and algal growth. *New Phytol.* 110, 441-61.
- Renuand, S. T. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211, 195-214.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd.
- Rodolfi, L. C. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100-112.
- Saha, S. U. (2003). Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 263-72.
- Santiago, G. (2010). Síntesis de estructuras metal-orgánicas (MOFs) y su aplicación en catálisis. St Andrews, Gran Bretaña.
- Schuchardt, U. R. (1998). Transesterification of vegetable oils: a review. *J Braz Chem Soc* 9, 199-210.
- Scott, A. B. (2006). Alternative fuels: rolling out next-generation technologies. *Chemical Week. December 20-27*, 17-21.
- Scott, S. D. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 277-86.
- Shah, S. S. (2004). Biodiesel Preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. *Energy Fuels* 66, 1372-78.
- Sharma, Y. C. (2009). High yield and conversion of biodiesel from a nonedible feedstock (*Pongamia pinnata*). *Journal of agricultural and food* 58, 242-247.
- Shay, E. (1993). Biodiesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. *Biomass and Energy* 4, 227-242.
- Sheehan, J. T. (1998). A look back at the U.S Department of Energy's Aquatic Species Program- Biodiesel from microalgae. *National Renewable Energy Laboratory*, 1-296.
- Shi, J. P. (2007). Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *J. Appl. Phycol.* 19, 417-23.

- Singh, R. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production- A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2347-53.
- Sonntag, N. (1979a). Structure and composition of fats and oils. *Bailey's industrial oil and fats products, vol. 1, 4th edition, ed. Swern, D., John Wiley & Sons, New York, p1, 1.*
- Staphanopoulos, G. F.-M. (2008). Selection and optimization of microbial host for biofuels production. *Metabolic Engineering* 10, 295-304.
- Thompson, G. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 17-45.
- Tsarenko, P. W. (2011). Sphaeropleales. *Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography* 3, 280-355.
- Tsoglin, L. G. (1996). Closed photobioreactors for microalgal production. *Russ J Plant Physiol* 43, 131-6.
- Tsukahara K, S. S. (2005). Liquid fuel production using microalgae. *Journal of the Japan petroleum institute* 48, 251-59.
- Urbanchuk, J. (2013). Economic impacts on the farm community of cooperative ownership of ethanol production. *Renew Energy*, 985-990.
- Usui, N. I. (1997). The biological CO<sub>2</sub> fixation and utilization project by RITE (1)- highly-effective photobioreactor system. *Energy Convers*, 487-92.
- Verma, N. M. (2010). Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *African Journal of Biotechnology* 9, 1402-11.
- Wang B, L. Y. (2008). CO<sub>2</sub> mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 707-18.
- Wright, H. S. (1994). A report on ester interchange. . *Oil and Soap* 21, 145-148.
- Yan-Shuo, L. H.-L. (2010). Controllable Synthesis of Metal-Organic Frameworks: From MOF Nanorods to Oriented MOF Membranes. *Advanced Materials* 22, 3322-26.
- Yeh, K. C. (2011). Nitrogen starvation strategies and photobioreactor desing from enhancing lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella v.* *Biotechnol. J.* 6, 1358-66.