



# **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO**

**INTEGRAL REGIONAL. Unidad Oaxaca**

**Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de los Recursos Naturales**

**(Ingeniería de Procesos)**

## **Efecto de la temperatura de secado en los lípidos contenidos en microalgas**

Alumna:

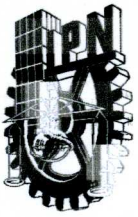
**Montoya García Dainiz Noray**

Directores:

**Dr. Juan Rodríguez Ramírez**

**Dr. Luis Carlos Fernández Linares**

Oaxaca de Juárez, Junio de 2012



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca siendo las 12 horas del día 8 del mes de Junio del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-OAXACA para examinar la tesis titulada:

Efecto de la temperatura de secado en los lípidos contenidos en microalgas

Presentada por el alumno:

<u>Montoya</u>	<u>García</u>	<u>Dainiz Noray</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>A</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td><td>0</td><td>3</td> </tr> </table>			A	1	0	0	2	0	3
A	1	0	0	2	0	3			

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Juan Rodríguez Ramírez

Dr. Luis Carlos Fernández Linares

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

Dr. Pedro Montes García

Dr. Sadóth Sandoval Torres

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Rafael Pérez Pacheco





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 07 del mes junio del año 2012, el (la) que suscribe **Montoya García Dainiz Noray** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **A100203**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dres. Juan Rodríguez Ramírez y Luis Carlos Fernández Linares y cede los derechos del trabajo titulado: **"Efecto de la temperatura de secado en los lípidos contenidos en microalgas"** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: [posgradoax@ipn.mx](mailto:posgradoax@ipn.mx) ó [dainizmontoya@yahoo.com.mx](mailto:dainizmontoya@yahoo.com.mx) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**Montoya García Dainiz Noray**



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.

## Resumen

Ante la creciente demanda de energéticos por parte de los países desarrollados y ante el agotamiento de las fuentes no renovables de energía, la humanidad en un corto periodo de tiempo enfrentará crisis financieras, ecológicas y sociales. Con ello, la comunidad científica afirma que el sistema energético actual es insustentable; motivo por el cual se están buscando alternativas energéticas que sean amigables con el medio ambiente, económicas y que conlleven un beneficio a las sociedades. Entre estas opciones se encuentra la producción de biodiesel a partir de microalgas, sin embargo, su elaboración enfrenta dilemas en cuanto a la eliminación del agua y la extracción de ácidos grasos lo que se ve reflejado en costos de producción. Este trabajo analizó el efecto de la temperatura de secado sobre los ácidos grasos contenidos en dos microalgas: *Scenedesmus sp.* y *Neochloris oleoabundans*. Las biomásas concentradas de las dos microalgas fueron secadas a 20, 40, 60, 80 y 100°C, y la extracción de lípidos se llevó a cabo por dos métodos: Soxhlet con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH}$  (2:1 v/v) durante 4 h y Sonicación, únicamente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en 1 h. Los análisis de los ácidos grasos se hicieron por CG-MS.

Los resultados mostraron que la cantidad y el tipo de ácidos grasos recuperados fueron afectados por la temperatura de secado pero también por el método de extracción. Para el caso de *N. oleoabundans*, con el método de extracción Soxhlet se obtuvieron ácidos grasos de entre 16 y 18 carbonos, mientras que por Sonicación las estructuras fueron de entre 14 y 24 carbonos con una mayor presencia a en las muestras secadas a 40°C que a 100°C. Para el caso de *Scenedesmus sp.* por Soxhlet se obtuvieron compuestos de 16 a 22 carbonos, mostrando una menor presencia en las muestras deshidratadas a 100°C; y con el método de Sonicación se recuperaron compuestos de 17 y 16 carbonos.

## Abstract

With the increase of the energy demand from developed countries and to the depletion of energy sources seedlings, humanity face in a short period of time financial, ecological and social crises. With this, the scientific community says that the current energy system is unsustainable, therefore they are looking for energy alternatives that could be friendly to the environment, economic and beneficial to the society. Among these options is the production of biodiesel from microalgae, however, its development faces dilemmas in terms of the water remotion from the biomass and extraction of fatty acids which is reflected in costs of production.

This study analyzed the effect of drying temperature on the fatty acids contained in two microalgae: *Scenedesmus sp.* and *Neochloris oleoabundans*. The concentrated biomass of the two microalgae were dried at 20, 40, 60, 80 and 100 ° C and the lipid extraction was carried out by two methods: Soxhlet with a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>OH (2:1 v / v ) during 4 h and Sonication only with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> during 1 h at 25°C. The fatty acid analysis was done by GC-MS. The results showed that the amount and type of fatty acid recovered were affected by the drying temperature but also by the extraction method. For the case of *N. oleoabundans*, with the Soxhlet extraction method the fatty acids obtained were from 16 to 18 carbons, while by Sonication structures were between 14 and 24 carbons with a greater presence in samples dried at 40 ° C than at 100 ° C . For the case of *Scenedesmus sp.* compounds were obtained by Soxhlet 16 to 22 carbons, showing a reduced presence in samples dried at 100 ° C, and with the method of Sonication was recovered with 17 and 16 carbons.

## Indice

1. Introducción.....	5
2. Planteamiento del Problema.....	7
3. Justificación .....	8
4. Antecedentes.....	9
5. Hipótesis .....	12
6. Objetivos.....	12
6.1 Objetivo General.....	12
6.2 Objetivos específicos .....	12
7. Marco conceptual.....	13
7.1 Biocombustibles .....	13
7.1.1 Biodiesel .....	13
7.1.1.1. Influencia de los ácidos grasos en las propiedades fisicoquímicas del biodiesel .....	14
7.1.1.2 Ventajas y desventajas del biodiesel.....	16
7.1.1.3 Debates en torno a los aceites vegetales y grasas animales como materia prima para la producción de biodiesel.....	17
7.2.1 <i>Scenedesmus sp.</i> .....	21
7.2.2 <i>Neochloris oleoabundans</i> .....	22
7.3 Lípidos.....	23
7.3.1 Ácidos grasos .....	24
7.3.1.1 Propiedades de los ácidos grasos.....	25
7.3.2 Lípidos en Algas .....	26
7.3.3 Extracción de lípidos.....	26
7.4 Proceso de secado .....	27
8. Materiales y Metodología .....	30
8.1 Cultivo de las microalgas .....	30

8.1.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento .....	30
8.1.3 Fotobiorreactores.....	31
8.1.4 Inóculo .....	31
8.1.5 Determinación de biomasa: DO (Densidad Óptica) y PS (Peso Seco) .....	32
8.2 Concentración de la biomasa .....	32
8.2.1 Determinación de contenido de agua en la biomasa concentrada .....	33
8.3 Pruebas de secado de la biomasa de las microalgas.....	33
8.4 Extracción de lípidos.....	34
8.4.1 Extracción del Extracto Orgánico Total (EOT) por Soxhlet .....	34
8.4.2 Extracción del Extracto Orgánico Total (EOT) por Sonicación.....	35
8.4.3 Metilación .....	36
8.5 Análisis de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases – masas (GC -MS) ..	37
9. Resultados y Discusión .....	39
9.1 Cinéticas de Secado de <i>N. oleoabundans</i> .....	39
9.2 Cinéticas de Secado de <i>Scenedesmus sp.</i> .....	41
9.3 Efecto de la temperatura de secado en las características físicas de <i>N. oleoabundans</i> y <i>Scenedesmus sp.</i> .....	43
9.4 Extracción de lípidos.....	45
9.4.1 Extracción de lípidos por el método Soxhlet.....	45
9.4.2 Método de Sonicación.....	47
9.5 Comparación cualitativa de los ácidos grasos presentes en <i>N. oleoabundans</i> y <i>Scenedesmus sp.</i> extraídos por los métodos Soxhlet y Sonicación.....	49
9.5.1 Comparación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos presentes en <i>N. oleoabundans</i> .....	49
9.5.2 Comparación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos presentes en <i>Scenedesmus sp.</i> .....	54
9.5.3 Comparación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos por medio de la Hidrólisis ácida en <i>N. oleoabundans</i> y <i>Scenedesmus sp.</i> .....	58
10. Conclusiones.....	63
11. Bibliografía.....	65

## Índice de Tablas

Tabla 1. Contenido lipídico de algunas microalgas en condiciones autotróficas.....	20
Tabla 2. Caracterización de los tratamientos térmicos sobre <i>N. oleoabundans</i> .....	40
Tabla 3. Caracterización de los tratamientos térmicos sobre <i>Scenedesmus sp.</i> .....	42
Tabla 4. Ácidos grasos obtenidos por el método Soxhlet en <i>N. oleoabundans</i> .....	49
Tabla 5. Ácidos grasos obtenidos por el método Sonicación en <i>N. oleoabundans</i> .....	51
Tabla 6. Ácidos grasos obtenidos por el método Soxhlet en <i>Scenedesmus sp.</i> .....	54
Tabla 7. Ácidos grasos obtenidos por el método Sonicación en <i>Scenedesmus sp.</i> .....	56
Tabla 8. Ácidos grasos obtenidos en muestras frescas hidrolizadas y sin hidrolizar en <i>N. oleoabundans</i> .....	58
Tabla 9. Ácidos grasos obtenidos en muestras frescas hidrolizadas y sin hidrolizar en <i>Scenedesmus sp.</i> .....	60

## Índice de Figuras

Figura 1. Reacción de Transesterificación .....	14
Figura 2. <i>Scenedesmus sp.</i> .....	22
Figura 3. <i>Neochloris oleoabundans</i> .....	22
Figura 4. Estructura de un triglicérido .....	24
Figura 5. Esquema de un Fotobiorreactor de 10 L. ....	31
Figura 6. Equipo de extracción Soxhlet .....	34
Figura 7. Rotavapor RE300 Yamato .....	35
Figura 8. Embudo de separación con las Fases orgánica y acuosa .....	36
Figura 9. Calentamiento del matraz con CH <sub>3</sub> OH y BF <sub>3</sub> durante la metilación .....	37
Figura 10. Cromatógrafo de Gases-Masas .....	38
Figura 11. Curvas de secado a diferentes temperaturas en <i>N. oleoabundans</i> .....	39
Figura 12. Curvas de secado a diferentes temperaturas en <i>Scenedesmus sp.</i> .....	41



Figura 13. Aspectos físicos de las microalgas al efecto térmico: a) fresca, b)a 20°C, c) 100°C .....	43
Figura 14. Porcentaje de ETO recuperado de <i>N. oleoabundans</i> .....	46
Figura 15. Porcentaje de ETO recuperado de <i>Scenedesmus sp</i> .....	46
Figura 16. Coloraciones en las microalgas después de la Sonicación. (De izq a derecha: <i>N. oleoabundans</i> a 40°C, <i>N. oleoabundans</i> a 100°C, <i>Scenedesmus sp</i> , a 40°C, <i>Scenedesmus sp</i> . a 100°C, Mtra fresca de <i>N. oleoabundans</i> ) .....	48
Figura 17. Porcentajes de ácidos grasos en <i>N. oleoabundans</i> extraídos por Soxhlet .....	50
Figura 18. Extracciones totales por Soxhlet en <i>N. oleoabundans</i> .....	51
Figura 19. Porcentajes de ácidos grasos en <i>N. oleoabundans</i> extraídos por Sonicación.....	53
Figura 20. Extracciones totales por Sonicación en <i>N. oleoabundans</i> .....	53
Figura 21. Porcentajes de ácidos grasos en <i>Scenedesmus sp.</i> extraídos por Soxhlet.....	55
Figura 22. Extracciones totales por Soxhlet en <i>Scenedesmus sp.</i> .....	56
Figura 23. Aspectos físicos de las microalgas:a) muestras no hidrolizadas, b) hidrólisis ácida, c) muestra hidrolizada después de la Sonicación. ....	58
Figura 24. Porcentajes de ácidos grasos en <i>N. oleoabundans</i> extraídos por hidrólisis y sin hidrolisis.....	60
Figura 25. Porcentajes de ácidos grasos en <i>Scenedesmus sp.</i> extraídos por hidrólisis y sin hidrolisis.....	61

## 1. Introducción

Es bien sabido que el consumo de energía está directamente ligado al grado de desarrollo económico e industrial de los países (Sarukán, 2007). Tomando en cuenta que las demandas energéticas van en aumento, principalmente en los países más desarrollados, que existe una degradación ecológica, y que las principales fuentes no renovables de energía (carbón mineral y petróleo) se están agotando, se han venido produciendo importantes desequilibrios que en un periodo corto de tiempo conducirán irremediablemente a crisis financieras, ecológicas y sociales muy severas con resultados catastróficos, en particular para las economías emergentes.

Con estos antecedentes se infiere que el sistema energético actual es insostenible e insustentable (Demirbas, 2010). Por ello, actualmente países como Estados Unidos, Brasil y Alemania están desarrollando energías alternativas que puedan hacer frente a esta crisis energética. Dentro de estas opciones se encuentran los biocombustibles, donde destacan el biodiesel, el bioetanol y el biogas. Sin embargo, todavía hay inconvenientes en su producción. En consecuencia, la necesidad de hacer estudios sobre la mejora de materias primas y de los procesos se vuelve indispensable y además, que estas investigaciones tengan un enfoque integral para mantener un equilibrio sustentable con el planeta.

El biodiesel es un combustible producido a partir de ácidos grasos provenientes de plantas oleaginosas, grasas animales, aceites orgánicos reciclados, así como de las microalgas. Sin embargo, el uso de plantas oleaginosas supone un deterioro importante al medio ambiente y a las sociedades debido principalmente al empleo de fertilizantes y otros químicos que resultan nocivos para el entorno; crea una mayor demanda de tierras cultivables, lo que incrementa la deforestación de bosques y selvas tropicales; compite con la producción de alimentos para consumo humano, lo que provoca problemas de escasez e incremento en los precios de los mismos (Chisti, 2008). Por otro lado, las grasas

animales junto con los aceites reciclados pueden ser adquiridos de una manera sencilla y a un bajo costo. No obstante, se caracterizan por tener altos contenidos de ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés), que al momento de llevar a cabo la reacción de transesterificación en presencia de NaOH u otra base fuerte, generan jabones y agua, ocasionando problemas en la separación y purificación del biodiesel, lo que conlleva a bajos rendimientos del biocombustible, a un incremento en los costos de su producción y problemas mecánicos en los automóviles (Adatashi *et al.*, 2011; Moser, 2009).

Una alternativa que parece viable es el uso de las microalgas, ya que no compiten con los precios de los alimentos, absorben CO<sub>2</sub> de la atmósfera, lo que ayuda a reducir los gases de efecto invernadero; pueden presentar altas productividades de ácidos grasos y crecen en un menor tiempo con respecto a las plantas oleaginosas. No obstante, los problemas que enfrenta la producción de biodiesel a partir de estos microorganismos se centran principalmente en su cultivo y en la extracción de los ácidos grasos presentes en ellos.

Debido a que la gran mayoría de las microalgas se desarrollan en el agua (dulce o salada), es necesario contar con una alternativa viable que elimine la gran cantidad de este líquido presente en la biomasa cosechada sin que se vea afectada la extracción de los ácidos grasos. Una opción es la deshidratación de la biomasa por medios térmicos porque garantiza la eliminación de agua y supone un efecto menor en el contenido lipídico sobre todo, de cadenas de ácidos grasos que contengan entre 12 y 22 carbonos debido a que son los principales componentes del biodiesel. Este trabajo de investigación se centró en la evaluación del efecto que tienen diferentes temperaturas de secado sobre los ácidos grasos presentes en dos especies de microalgas.

## 2. Planteamiento del Problema

El interés por generar biodiesel a partir de las microalgas es enorme, sin embargo, existen aún muchos retos que necesitan ser abordados para permitir su producción comercial a una escala suficiente que genere una contribución significativa a las necesidades energéticas actuales, como las del transporte (Scott *et al.*, 2010).

Algunos análisis económicos y de factibilidad muestran que el proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas presenta mayores requerimientos de energía comparados con el beneficio energético del biocombustible. La concentración de la biomasa y la extracción de lípidos son dos etapas que requieren altos consumos de energía. Por un lado, se han llevado a cabo extracciones de ácidos grasos vía húmeda, es decir, con un contenido alto de agua en la biomasa, y se ha visto que reduce significativamente los requerimientos energéticos, aunque presenta menores rendimientos en la recuperación de lípidos; por otro lado, la extracción de lípidos por vía seca, empleando por ejemplo secadores solares para el secado de la biomasa debido a su practicidad y bajo costo, muestra una degradación de los lípidos durante el secado, y por lo que su uso también resulta cuestionable (Lardon *et al.*, 2009).

Es claro entonces que debe llevarse a cabo una investigación específica para desarrollar nuevos procesos de extracción que representen la mínima afectación al contenido lipídico presente en la biomasa de las microalgas y que haga del biodiesel un combustible con mayor viabilidad.

### 3. Justificación

En la actualidad, los impedimentos para la generación de grandes cantidades de biomasa a partir de microalgas para producir biodiesel son principalmente técnicos. Los costos de producción de este biocombustible pueden ser mejorados con avances tecnológicos, algunos de ellos, destinados a la remoción del alto contenido de humedad que presenta la biomasa después de ser concentrada y en la eficiencia en extracción de los lípidos (Chisti, 2008).

Se sabe que el secado de productos orgánicos busca principalmente reducir la actividad microbiana y posibles reacciones químicas que afecten su conservación, así como aumentar la capacidad de almacenamiento y facilitar su transportación como beneficio directo de la disminución su tamaño y masa. También se sabe que el secado no sólo tiene un impacto sobre el contenido de agua de un material, sino también en sus propiedades físicas, químicas y biológicas. No obstante, el asegurar el manejo adecuado de las condiciones de la deshidratación, garantiza que el producto final tenga un alto valor económico y técnico (Barbosa, 2000).

En el caso de las microalgas, su fracción lipídica puede contener cantidades semejantes o superiores a la de plantas oleaginosas, en consecuencia, es trascendental considerar un método que afiance la mayor cantidad de lípidos extraídos debido a que es un factor determinante en el rendimiento final del biocombustible, al mismo tiempo que da la pauta para emplear estos compuestos en otras industrias (alimenticia, cosmética, medicinal) (Zepka, 2007).

#### 4. Antecedentes

Los estudios previos sobre el secado y extracción de lípidos de algas muestran lo siguiente:

Lopes *et al.*, (2007) caracterizaron el secado de la biomasa de la cianobacteria *Aphanothece microscópica Nägeli* en capas delgadas (thin layer) proveniente de cultivos de arroz. La biomasa presentó un contenido de agua inicial del 95% y se usaron tres temperaturas de secado (40, 50 y 60°C) con un espesor de capa de 7mm. Como resultados encontraron que el agua se transfiere al aire como vapor y de forma constante durante la primera fase del proceso, lo cual es característico de los materiales con alto contenido de agua; además, el contenido de agua final o humedad de equilibrio de las muestras osciló entre un 5 y 11% (40°C – 11%, 50°C 10% y 60°C 5%) donde se evidenció que la temperatura más alta es la que permitió una buena calidad comercial en la biomasa seca. Observaron también que la difusión de agua está influida por la temperatura de secado (40°C,  $9.9 \times 10^{-8}$ ; 50°C,  $15.9 \times 10^{-8}$ ; 60°C,  $18.8 \times 10^{-8}$  m/s). Finalmente concluyeron que la temperatura y las condiciones del aire tienen una fuerte influencia sobre la tasa de agua que se pierde en la primera etapa del secado y sobre los efectos físicos sobre el material.

Vega Galvez *et al.*, (2007) estudiaron y simularon mediante ecuaciones empíricas la cinética de secado por aire caliente de la macroalga *Gracilaria chilensis* para obtener un alga seca de calidad comercial. Se determinaron isotermas de desorción a tres temperaturas (5, 25 y 40°C), mientras que el secado del alga se hizo en un secador convectivo de bandejas a cinco temperaturas (30, 40, 50, 60 y 70°C) con una velocidad constante de 2.0 m/s ( $\pm 0.2$ ) y se emplearon 100 g ( $\pm 2$ ) de la muestra. El contenido de agua de la muestras del alga fue de 6.45 g de agua/g masa seca ( $\pm 0.40$ ). Los resultados evidenciaron que las curvas de secado de las muestras se vieron afectadas al aumentar la temperatura, lo que llevó a disminuir el tiempo de secado y a determinar el tiempo necesario para alcanzar un contenido de agua final de 18%, que es un estándar comercial, según algunas normas chilenas en la materia. Asimismo, las curvas de secado dependieron

de la temperatura pues al aumentar ésta, la pendiente también se incrementa. Finalmente se observó una dependencia de la difusividad con la temperatura.

Zepka *et al.*, (2007) evaluaron el efecto del procesamiento térmico sobre el perfil de ácidos grasos de la cianobacteria *Aphanothece microscópica Nägeli*. La biomasa fue deshidratada en un secador de bandejas de espesor de 7 mm bajo un venteo paralelo a 1.5 m/s y a temperaturas de 40, 50 y 60°C. Los resultados señalaron que el contenido de lípidos varió significativamente entre 7.15% y 7.90% a temperaturas de 50°C y 60°C. Se observó un predominio de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), destacando el ácido  $\gamma$ -linolénico (C18:3), el ácido palmítico (C16:0) y el ácido linoleico (C18:2). Hicieron un análisis de la relación entre los ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados, encontrando que a 60°C ésta fue de 1,48, lo que significa una presencia mayor de ácidos grasos insaturados. Finalmente, por medio del análisis de varianza y la prueba de Tukey, observaron que hay diferencias significativas para todos los ácidos grasos, en las diferentes condiciones de secado, independientemente del tamaño de las cadenas estructurales.

Stewart *et al.*, (2003) examinaron y cuantificaron el grado de los cambios que sufren los ácidos grasos insaturados de la soya durante el secado y evaluar el efecto de un inhibidor de tripsina. El contenido de agua inicial en el material fue de 18% y se secó en un horno de aire caliente a 75°C durante 2 días. Los resultados mostraron que una reducción significativa en el contenido de ácidos grasos insaturados y una degradación por efecto del tiempo de secado afectando a ácido erúcido, oleico, araquidónico y linoleico más que de la temperatura. Concluyeron que los alimentos con altos contenidos de PUFAs son más susceptibles a degradación por efectos térmicos y tiempos de exposición, lo que afecta su calidad comercial o nutrimental.

Azad Shah *et al.*, (2009) estudiaron los cambios que sufren los lípidos y que se produce en el sabor durante el secado del pescado *Misaky-nishin*. Las muestras de este pescado

secadas usando ventilador eléctrico, la temperatura del lugar y la humedad relativa se mantuvieron aproximadamente en 17°C y 45% respectivamente durante 2, 4, 6, 8, y 10 días. Los resultados mostraron cambios en el pH (un decremento de 6.69 a 6.42), se produjo un aumento en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados durante los primeros 4 días; el contenido total de lípidos decreció durante los 10 días de secado. Se presentaron cambios significativos en cuanto a los tipos de lípidos: la cantidad de triglicéridos se redujo notablemente mientras que el número de ácidos grasos libres se incrementó, a pesar que el ácido oleico y el palmítico estuvieron presentes en mayor cantidad en la fracción de los triglicéridos. Los ácidos saturados y monosaturados también decrecieron, pero no a un ritmo como los insaturados. Como conclusión, determinaron que el secado de sobre este pescado causa cambios importantes en la composición de los ácidos grasos pues se llevó a cabo una oxidación lipídica.



## 5. Hipótesis

La temperatura de secado de la biomasa de las microalgas *Scenedesmus sp.* y *Neochloris oleoabundans* tiene un efecto en la cantidad y en el número de ácidos grasos recuperados principalmente de cadenas de 12 a 22 átomos de carbono.

## 6. Objetivos

### 6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura de secado sobre la cantidad y tipo de ácidos grasos extraídos de las microalgas *Scenedesmus sp* y *Neochloris oleoabundans*.

### 6.2 Objetivos específicos

- Determinar el tiempo de secado de las biomásas concentradas de las microalgas *Scenedesmus sp.* y *Neochloris oleoabundans* en función de la temperatura de secado.
- Evaluar el efecto de la temperatura de secado sobre los ácidos grasos (estructura y cantidad) extraídos de las dos microalgas.
- Comparar dos métodos de extracción de ácidos grasos de las dos microalgas.

## **7. Marco conceptual**

### **7.1 Biocombustibles**

Los biocombustibles son todos aquellos combustibles que tienen un origen orgánico (no fósiles) y son obtenidos de manera renovable. En la actualidad, existen tres principales carburantes con este origen: bioetanol, biodiesel y biogas. Las fuentes para producir bioetanol son principalmente la caña de azúcar, el maíz, sorgo, yuca, sustancias ricas en almidón (maíz, trigo, cebada), así como a partir de la hidrólisis de sustancias celulósicas (madera y residuos vegetales). Para generar biodiesel es necesario una fuente de aceite ya sea vegetal (de palmas, coco, higuera, soja, jatropha, colza, entre otros) o animal. Finalmente el biogás se forma a partir de la fermentación anaerobia de material orgánico obteniendo metano y dióxido de carbono.

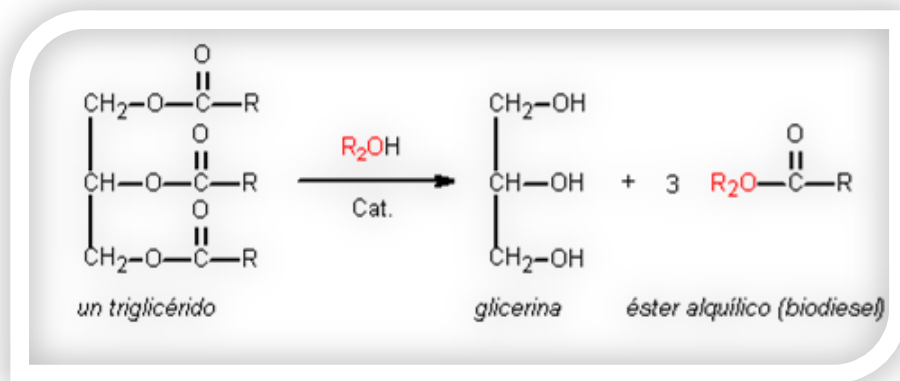
#### **7.1.1 Biodiesel**

El biodiesel es definido según la ASTM Internacional como un combustible formado por monoalquil ésteres de cadena larga de ácidos grasos (C14:0 – C22:0; FFAE, por sus siglas en inglés) derivados de aceites vegetales o animales y que cumplen con los requerimientos de la norma ASTM 6751. Se sabe que los aceites vegetales y animales contienen en estado natural gran cantidad de triglicéridos, que consisten en largas cadenas de ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol (Moser, 2009, Ramezani, *et al.*, 2010).

El origen de este biocombustible se remonta al año de 1900, donde Rudolf Diesel utilizó aceite de cacahuate para impulsar el motor que había inventado. Sin embargo, el aumento en el uso de petróleo y su bajo costo propiciaron su preferencia y la aparición del diesel. Actualmente se ha fortalecido y promovido el uso de biodiesel debido a los

problemas ambientales y económicos que la humanidad enfrenta con el interés de sustituir a los combustibles fósiles.

En cuanto a la producción del biodiesel, el proceso químico que lo forma es conocido como transesterificación (Tan *et al.*, 2010), donde los triglicéridos provenientes de los aceites vegetales o grasas animales reaccionan con un alcohol de cadena corta en presencia de un catalizador para formar alquil ésteres de ácidos grasos (FAAE) y glicerina (Fig. 1). Por cada mol de triglicérido empleada, se formarán tres moles de biodiesel y una de glicerina como subproducto.



**Figura 1. Reacción de Transesterificación**

Los catalizadores que comúnmente se emplean en la reacción de transesterificación son el hidróxido de sodio y el hidróxido de potasio por su bajo costo. La composición química del biodiesel depende de las materias primas con que fue hecho, por lo que factores como el clima y ubicaciones geográficas para el caso de plantas oleaginosas juegan un papel fundamental en el biodiesel como producto terminado.

#### **7.1.1.1. Influencia de los ácidos grasos en las propiedades fisicoquímicas del biodiesel**

La naturaleza y estructura de los ácidos grasos son determinantes en las propiedades del biodiesel, las cuales están relacionadas con la estructura molecular, la longitud de la cadena, el grado de insaturación, la orientación de los doble enlaces y el tipo de éster (metílico, etílico, etc.; Moser, 2009).

De acuerdo con Ramírez- Verduzco *et al.*, (2012) el número de cetanos y la energía del combustible se incrementan debido a un peso molecular elevado y la longitud de las cadenas de los ácidos grasos; no obstante estas propiedades se decrementan cuando el número de dobles enlaces es elevado. Asimismo, la viscosidad aumenta cuando se tienen cadenas largas de ácidos grasos saturados, esto debido a que las fuerzas de Van der Waals crecen en relación con la longitud de las partes no polares de los ácidos grasos metilados (FAMEs), con su geometría espacial y las interacciones intermoleculares. El punto de fusión de ve afectado por las insaturaciones, ya que provocan que éste disminuya (Moser 2009; Moser y Vaugh, 2012).

Otras propiedades como la densidad, son favorecidas por el número de insaturaciones y peso molecular que presenten los ácidos grasos (Ramírez- Verduzco, *et al.*, 2012). La capacidad de oxidación del biodiesel está relacionada con los sitios con dobles enlaces y con los metilenos en las cadenas, pues en presencia de factores como luz, calor, hidroperóxidos y algunos metales, generan radicales que libres que reaccionan rápidamente con el oxígeno del ambiente; en este caso, las insaturaciones de tipo *trans* son termodinámicamente más estables que las *cis*. El calor de combustión está afectado por la relación carbono, hidrogeno y oxígeno. Generalmente si el contenido de oxígeno aumenta en los FFAE, la energía del biodiesel disminuye, pero si existe una relación de carbono- hidrógeno y es baja, la energía aumenta (Moser, 2009).

Por otro lado, las emisiones de NOx por parte del biodiesel están influidas por las estructuras de los ácidos grasos pues este gas es generado por reacciones complejas de los radicales de hidrocarburos (cadenas de los ácidos grasos) con el nitrógeno del

ambiente que consecuentemente reaccionan con el oxígeno. Si las cadenas son cortas o se incrementa el número de dobles enlaces hay mayores posibilidades de emisiones de este gas.

De la misma manera, la presencia de contaminantes y de compuestos menores influyen en las propiedades del biodiesel como la operatividad a bajas temperatura, la viscosidad cinemática, la estabilidad oxidativa, las emisiones al ambiente, el número de cetanos y la capacidad calorífica. Estos compuestos dependiendo del origen de las materias primas (animales o vegetales) pueden ser: tocoferoles, fosfolípidos, glucósidos esteroides, clorofilas, vitaminas solubles en grasas e hidrocarburos (alcanos, escualenos, carotenos, compuestos aromáticos policíclicos), que al momento de reaccionar en la transesterificación pueden producir ácidos grasos libres, jabones, alcoholes, glicéridos, agua, entre otros (Moser, 2009; Moser y Vaughn, 2012).

Así mismo, la naturaleza de la materia prima tiene una influencia en el biodiesel. En este sentido se sabe que si el material contiene un porcentaje superior al 3% de ácidos grasos libres y se lleva a cabo una transesterificación con hidróxidos de sodio o potasio, los resultados serán indeseados pues se formarán jabones y agua, siendo éste particularmente problemático porque en presencia de cualquier catalizador, podría haber una hidrólisis con el biodiesel generando más ácidos grasos libres y metanol (Moser, 2009).

#### **7.1.1.2 Ventajas y desventajas del biodiesel**

El biodiesel ha atraído la atención por ser una alternativa energética, ya que es miscible en petrodiesel en cualquier proporción y presenta ventajas técnicas sobre éste; por mencionar algunas: tiene baja toxicidad y volatilidad, proviene de fuentes orgánicas (renovables), contiene bajos contenidos de azufre; alta biodegradabilidad y punto de

inflamación, puede utilizar la infraestructura actual de almacenamiento y distribución para el diesel proveniente del petróleo.

En cuanto a los problemas mecánicos, el biodiesel ataca a las mangueras de caucho por donde viaja hasta llegar a la cámara de combustión, provoca daños a la pintura del motor, tiende a formar depósitos u obstrucciones a bajas temperaturas del ambiente. Su poder calorífico es del orden de un 13% en masa más bajo que el petrodiesel y cerca del 8% por unidad de volumen, pero esto no se refleja exactamente en la pérdida de potencia ya que su densidad está ligeramente más alta que la del petrodiesel. No obstante, el biodiesel puede extender la vida útil de los motores debido a que posee mejores cualidades lubricantes que el combustible tradicional, mientras que el consumo, encendido, rendimiento y torque del motor se mantienen prácticamente en los mismos valores que el petrodiesel.

Con respecto a los impactos ambientales, las emisiones de NO<sub>x</sub> se incrementan proporcionalmente con el aumento de la concentración del biodiesel en mezclas con petrodiesel; no obstante se han aumentado los esfuerzos por reducir estas emanaciones. El biodiesel como combustible orgánico disminuye las emisiones de CO<sub>2</sub> y de SO<sub>2</sub> (debido a la ausencia de azufre), de hollín, de CO, de hidrocarburos (HC) hasta en un 90% los no quemados y entre un 75-90% los aromáticos. El olor de los gases desprendidos reemplaza al típico del petrodiesel por un olor similar a “papas fritas”. Algunos autores afirman que el uso de este biocombustible contribuye al cierre del ciclo del carbono, debido a que este gas es absorbido por medio de la fotosíntesis cuando se usan vegetales (Agudelo, *et al.*, 2003).

#### **7.1.1.3 Debates en torno a los aceites vegetales y grasas animales como materia prima para la producción de biodiesel**

El biodiesel es obtenido de aceites vegetales o grasas animales, siendo los primeros, la principal fuente, es por ello que el uso de cultivos oleaginosos ha puesto en debate su uso para un biocombustible o para producir alimentos.

En torno a esta controversia se ven involucrados factores como los altos costos de las materias primas para generar el combustible verde debido a las demandas en la producción de alimentos, el alto uso de fertilizantes pueden afectar los suelos, la necesidad de incrementar las tierras de cultivo lo que lleva a una deforestación de bosques y zonas tropicales, los altos requerimientos de agua y su contaminación, necesitan las plantas largos periodos de producción (años o meses) y dependen de factores climáticos y geográficos, así como el posible estallamiento de conflictos sociales (Ajanovic, 2010; Singh, *et al.*, 2011). Estos factores hacen que la factibilidad del uso de aceites vegetales para la producción de biodiesel sea nula o muy poco empleada.

Por otro lado, el uso de aceites de desecho y grasas animales disminuye el precio de los insumos, pero involucra inversiones en problemas en su refinamiento y en algunos no es posible alcanzar los volúmenes requeridos de biodiesel de acuerdo a las necesidades del mercado (Garibay, *et al.*, 2009), además que presenta grandes cantidades de ácidos grasos libres lo que afecta a la reacción de transesterificación.

Estas opciones no son viables, pues la sustentabilidad de la industria del biodiesel, requiere que las materias primas empleadas sean de bajo costo, de fácil manufactura, que puedan ser operadas continuamente y con altos rendimientos como son las microalgas.

Estos microorganismos tienen un enorme potencial para la captura CO<sub>2</sub> de la atmósfera, sus rendimientos de producción son altos comparados con plantas oleaginosas, tienen la capacidad de producir aceites entre un 20 y 50% por estrés metabólico (Chisti, 2008), además el perfil de ácidos grasos de las microalgas es relevante debido al poder calorífico del biodiesel resultante depende de esta composición (12-22 átomos de carbono

principalmente  $\omega_3$  y 6), lo que afecta también al proceso de transesterificación (Tan *et al.*, 2010).

El interés por general biodiesel a partir de las microalgas es enorme, sin embargo, existen aún muchos retos que necesitan ser abordados para permitir su producción comercial a una escala suficiente que genere una contribución significativa a las necesidades energéticas del transporte (Scott *et al.*, 2010).

## 7.2 Algas

Las algas en términos generales son talofitas (plantas que carecen de raíces, tallos y hojas) que tienen a clorofila *a* como su primer pigmento fotosintético y su forma de reproducción es sexual o asexual (Lee, 2008). Comúnmente se les encuentra en el agua (dulce, marina, salobre), pero también en casi todos los ecosistemas del planeta y en simbiosis con su medio ambiente. Son además productores primarios en las cadenas tróficas y responsables de la generación del 50% del oxígeno y la fijación del 50% del carbono en la Tierra (Garibay, 2009).

Desde la antigüedad, las algas se han usado como fuente de alimento, pero hasta la actualidad que han despertado el interés de la comunidad científica por su potencial biotecnológico. Su estudio empezó en los años cincuenta y sesenta al ser considerados como una fuente barata de proteínas. A partir de los la década de los setentas y a raíz de la crisis energética, se iniciaron proyectos de investigación de las microalgas como fuente renovable de energía, produciendo etanol por fermentación y biodiesel.

Las razones que motivan el uso de las microalgas como fuente de biodiesel son que es una alternativa que promueve la satisfacción de las demandas actuales de este combustible además que puede reemplazar al petrodiesel (Chisti, 2008); no necesitan grandes extensiones de tierra para su cultivo, presentan altos rendimientos de lípidos, no ponen



en peligro la demanda de alimentos, favorecen el ciclo del carbono, ofrecen subproductos de valor agregado (proteínas, almidones, entre otros), los periodos de producción son cortos (días; Rosenbert *et al.*, 2008; Singh, *et al.*, 2010).

Las microalgas con elevadas productividades lípidicas son deseables para la producción de biodiesel, pero dependen de la velocidad de crecimiento del alga y de las condiciones de cultivo. En el presente, se han estudiado diversos géneros y especies de microalgas que potencialmente pueden ser empleadas para la obtención de lípidos (específicamente ácidos grasos) y con ello fabricar biodiesel, por su capacidad para generarlos y por los tipos y estructuras que conforman al biocombustible. Algunas de estas especies son *Neochloris oleoabundans* (Pruvost *et al.*, 2009) y *Scenedesmus sp* (Lin, 2011), sin embargo existen muchas más como las mostradas en la tabla 1, donde el contenido lipídico comprende desde un 20% hasta un 80% (Garibay *et al.*, 2009).

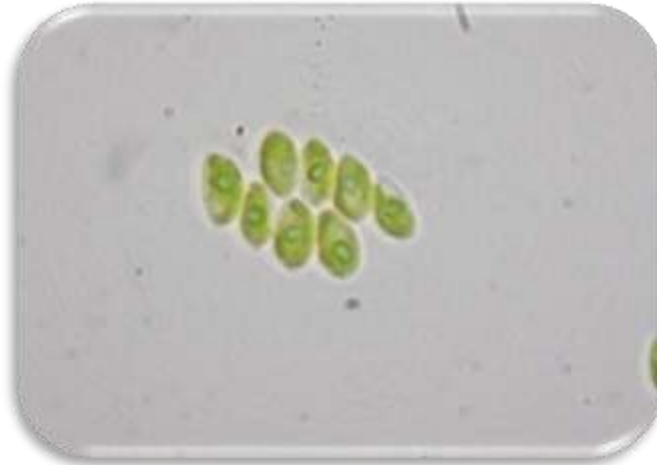
**Tabla 1. Contenido lipídico de algunas microalgas en condiciones autotróficas**

Especie	%Contenido lipídico [g lípidos/ gr peso seco x 100]	Especie	%Contenido lipídico [g lípidos/ gr peso seco x 100]
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24.5- 40.3	<i>Hormotilopsis gelatinosa</i>	49.1
<i>Botryococcus braunii</i> var. A	43-63	<i>Monallantus salina</i>	20.0-72.2
<i>Botryococcus braunii</i> var. B	53-86	<i>Nannochloris sp.</i>	20.0-47.8
<i>Botryococcus sudeticus</i>	9.39-23.09	<i>Nannochloropsis salina</i>	49.8-72.2
<i>Chaetoceros gracilis</i>	46	<i>Naviculla pelliculosa</i>	22.0-44.8
<i>Chlorella emersonii</i>	63	<i>Neochloris oleoabundans</i>	18.9-88.8
<i>Chlorella minutissima</i>	57	<i>Nitzschia laevis</i>	69.1
<i>Chlorella sorokiana</i>	22	<i>Ochromonas danica</i>	39-71
<i>Chlorella sp</i>	28-32	<i>Parietochloris incisa</i>	62
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.1-56.0	<i>Peridinium cinetum</i> fa. Westi	36
<i>Chrysochromulina kappa</i>	32.6	<i>Prymnesium parvm</i>	22.0-38.2
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.0-53.8	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	6-40
<i>Dunaliella salina</i>	9.2-47.2	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-55
<i>Euglena gracilis</i>	55	<i>Scotiella sp.</i>	34.5-48.0
<i>Hantzchia sp.</i>	61	<i>Stichococcus bacillaris</i>	38.9

Dentro del contenido lipídico presentes en las microalgas prevalecen los triglicéridos, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, fosfolípidos, glicolípidos y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas), no obstante, no todos los lípidos provenientes de estos microorganismos son satisfactorios para la producción de biodiesel. Los que si son adecuados son los triglicéridos y dentro de la fracción lipídica constituyen un 20% a 40% aproximadamente (Chisti, 2007; Arredondo-Vega y Vázquez-Duhalt, 1991). Por lo tanto, La selección de las especies más adecuadas para la producción de biodiesel deben tener ciertas características a considerar por ejemplo: la tasa de crecimiento, la cantidad y calidad de lípidos, las respuestas tenues ante perturbaciones ambientales y la competencia ante otras microalgas y bacterias, la preferencia por la captación de algún nutriente (CO<sub>2</sub> o nitrógeno), la fácil concentración de biomasa y la posibilidad de obtener químicos de valor agregado (Amaro *et al.*, 2010).

### **7.2.1 *Scenedesmus sp.***

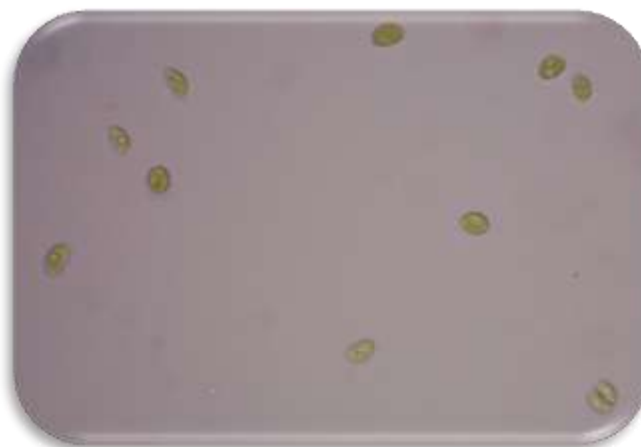
*Scenedesmus* (Fig. 2) es un alga no móvil que forma líneas de 2, 4, 8 o hasta 16 células, lo que se denomina como colonia. Como principales características, las especies de este género presentan formas cilíndricas, ovoides y de media luna o huso; difieren además en la textura de la pared celular, cuya estructura es compleja; y en el tipo de espinas que poseen en las células localizadas en los extremos de las algunas colonias. En ciertas circunstancias, por deficiencia de nitrógeno, forman gametos o células reproductivas que poseen uno o más flagelos, con los cuales pueden copular (Lee, 2008). Estas algas encuentran principalmente en el plancton, es común en aguas frescas y salinas (estuarios, por ejemplo) especialmente donde las condiciones de nutrimentos son altas (Van Den Hoek, 1995).



**Figura 2. *Scenedesmus* sp.**

### **7.2.2 *Neochloris oleoabundans***

*Neochloris oleoabundans* (Fig. 3) es una alga edáfica localizada en suelos áridos. Esta especie fue aislada en la cima de las dunas de Arabia Saudita en 1962. Su cultivo por un periodo de 5 a 7 días en un medio limitado de nitrógeno, puede generar un contenido de aceites del 35% al 54% en peso seco, en donde el 80% de esta fracción corresponde a triglicéridos y el resto a pigmentos, esteroides, glucolípidos y fosfolípidos (Garibay, 2008). Este perfil lipídico hace de esta alga una fuente de lípidos para la producción de biodiesel (Levine *et al.*, 2011) y otras aplicaciones industriales.



**Figura 3. *Neochloris oleoabundans***

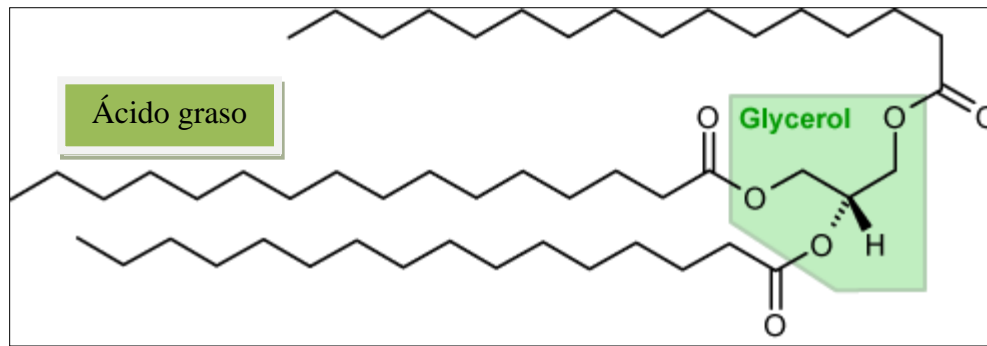
### 7.3 Lípidos

Los lípidos son definidos como aquellas sustancias que no se mezclan con el agua, sino en solventes no polares; son sustancias capaces de formar ésteres y tienen gran importancia en funciones estructurales o energéticas de los seres vivos (Laguna, 1967). Los lípidos se definen por sus propiedades físicas (solubilidad) más que por su estructura (McMurry, 2008).

Para su estudio, los lípidos se han clasificado en dos grandes grupos: complejos y simples. Los complejos se caracterizan su la facilidad que tienen para ser hidrolizados y formar compuestos más simples. La mayoría de los lípidos complejos son ésteres de ácidos carboxílicos de cadenas largas denominados ácidos grasos. Los conjuntos principales de los ésteres de los ácidos grasos son las ceras y los glicéridos, siendo las ceras ésteres de alcoholes de cadena larga y los glicerol, ésteres de glicerol.

En cambio los lípidos simples son aquellos que no se hidrolizan con facilidad con un ácido o una base acuosa. Cabe destacar que el término “simple” frecuentemente aparece inapropiado pues muchos lípidos de este grupo presentan moléculas bastante complejas. Los tres grupos importantes de estos lípidos simples son los esteroides, las prostaglandinas y los terpenos (Wade, 2004).

Los glicéridos son, como ya se mencionó, ésteres de ácidos grasos del triol glicerol. Los más comunes son los llamados triglicéridos (triacilglicerol), que son tres grupos  $-OH$  del glicerol esterificados por los ácidos grasos (Fig. 4).



**Figura 4. Estructura de un triglicérido**

Es común llamar a estos compuestos grasas si son sólidos a temperatura ambiente y aceites si son líquidos a la misma temperatura. En los animales de sangre caliente, sobre todo los mamíferos, las grasas se mantienen como fluidos lo que permite su movilidad por sus cuerpos; mientras que los animales de sangre fría, los triglicéridos son aceites, de lo contrario, no podrían mantener la temperatura corporal, ni almacenar energía. En el caso de los vegetales, los triglicéridos se presentan también en forma de aceites, y son esenciales como componentes estructurales en las membranas celulares, en los cloroplastos y en funciones celulares como la fotosíntesis (Laguna, 1967).

### 7.3.1 Ácidos grasos

Un ácido graso es una biomolécula orgánica de naturaleza lipídica formada por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de número par de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo (COOH). Cada átomo de carbono se une al siguiente y al precedente por medio de un enlace covalente sencillo o doble. Al átomo de su extremo le quedan libres tres enlaces que son ocupados por átomos de hidrógeno ( $H_3C-$ ). Son no ramificados de cadena larga con alrededor de 12 a 20 átomos de carbono debido ya que son derivados de unidades de ácido acético, el cual tiene dos átomos de carbono.

La gran mayoría de las grasas y aceites en estado natural son mezclas de triglicéridos que contienen una gran variedad de ácidos grasos saturados e insaturados. Incluso los triglicéridos individuales con frecuencia son mezclas que contienen dos o tres ácidos grasos diferentes. En general, los aceites de plantas y de animales de sangre fría contienen más insaturaciones que las grasas de animales de sangre caliente (Wade, 2008).

#### **7.3.1.1 Propiedades de los ácidos grasos**

Las propiedades de los ácidos grasos difieren significativamente en sus configuraciones estructurales. En cuanto a la polaridad, la cadena hidrocarbonada es apolar y cuanto más larga sea y con menos insaturaciones, tendrá menos solubilidad en el agua, mientras que el grupo carboxilo es polar. Estas dos características permiten que los ácidos grasos sean moléculas anfipáticas que pueden formar micelas en medio acuoso, y que sean menos densos que el agua.

El punto de fusión está condicionado por la longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada. Los ácidos grasos saturados tienen puntos de fusión que aumentan de manera gradual con sus masas moleculares, y sus enlaces sencillos hacen que los ácidos grasos adopten una disposición totalmente extendida y relativamente lineal por lo que forman estructuras casi cristalinas (grasas).

En cambio, los ácidos grasos insaturados *cis*, cada doble enlace provoca un quiebre en la linealidad de la estructura hidrocarbonada, lo que hace que estos ácidos grasos no se puedan empaquetar tan estrechamente como los saturados; por ello, en la naturaleza son generalmente líquidos (aceites) y tienen puntos de fusión más bajos. Por su parte, los ácidos grasos con insaturaciones *trans* tienen puntos de fusión más altos que sus equivalentes *cis*, debido a que esta configuración de dobles enlaces da estructuras lineales similares a las de los ácidos grasos saturados.

### 7.3.2 Lípidos en Algas

Las microalgas especialmente las pertenecientes a división de las Clorofitas (algas verdes) poseen gran cantidad de lípidos que les permiten llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis, ya que se encuentra en los cloroplastos, afectan la permeabilidad de las membranas y el metabolismo de otros compuestos orgánicos, proporcionan protección ante cambios en el ambiente (deficiencia de luz, nitrógeno, CO<sub>2</sub>, entre otros) y sirven como reserva de energía (Thompson Jr., 1996). Estos lípidos son: 1) Ceras insaturadas (comúnmente un doble enlace y saturadas); 2) Triglicéridos o grasas neutras, que se encuentran principalmente como reserva de energía; 3) esteroides, que se emplean con biomarcadores; 4) Glicerofosfolípidos o fosfolípidos que se encuentran en los cloroplastos, principalmente en las membranas tilacoidales y de los organelos relacionados, por lo que son indispensables en el proceso fotosintético (Rodríguez *et al.*, 2007)

### 7.3.3 Extracción de lípidos

Según algunos autores, los lípidos que se encuentran de forma natural en los tejidos, membranas celulares, etc. forman tres tipos de uniones con otros compuestos orgánicos: 1) Enlaces no polares de tipo Van der Waals o hidrofóbicas resultado de la interacción lípido-lípido (lípidos neutros como: esteroides, glicéridos, carotenoides, hidrocarburos); 2) uniones electrostáticas y puentes de hidrógeno resultado de la interacción lípido-proteína y lípido-carbohidrato (glicerofosfolípidos, glicolípidos y colesterol unidos a proteínas en las membranas de las células, mitocondrias y retículos endoplásmicos); y 3) Enlaces covalentes resultado de la unión de ácidos grasos y oxiácidos con polisacáridos formando ésteres y amidas (lipopolisacáridos de paredes bacterianas; Kates y Work, 1986).

De ahí, resulta indispensable saber que si se va a hacer un estudio de lípidos, es necesario saber las características y tipos de lípidos que se quieren analizar, y por lo tanto es importante seleccionar un sistema de solventes adecuados y que permita extraerlos de

una matriz biológica (células, tejidos, etc.), y que los pueda separar además de compuestos contenidos en esa misma matriz (proteínas, carbohidratos, pigmentos, etc.).

Dada la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de los lípidos, se utilizan mezclas de disolventes orgánicos de naturaleza polar (metanol, etanol, isopropanol, acetona) y no polar (éter de petróleo, cloroformo, tolueno, xileno, hexano). El uso de estas mezclas asegura la extracción de la mayoría de estos compuestos orgánicos. En muchos casos se necesita fraccionar los lípidos polares y no polares, pero aunque se pretendiera obtener solamente lípidos neutros, el disolvente no polar no los puede extraer porque se encuentran incluidos en moléculas polares como las proteínas y los carbohidratos. En el presente, existe una gran diversidad de métodos de extracción debido a que los tejidos vivos difieren en cuanto a su estructura, textura y contenido de lípidos. Uno de estos procedimientos utilizan un sistema cloroformo/metanol/agua propuesto por Folch en 1956 y mejorado por Bligh y Dyer tres años después.

#### **7.4 Proceso de secado**

Según Geankoplis (1998), el secado se refiere a la remoción de cantidades relativamente pequeñas de agua o cualquier líquido orgánico de un material. Se sabe que para el estudio de los fenómenos de secado es necesario mantener constantes las magnitudes como la temperatura, la humedad, la velocidad y cantidad de aire que afectan directamente las sustancias o propiedades en las muestras (Kneule, 1982).

En el proceso de secado es necesario considerar las relaciones de equilibrio entre el material, el vapor de agua y el aire. Al secar un material por un tiempo determinado habrá un momento en que la humedad será definida o constante. Este valor se conoce como humedad de equilibrio (Geankoplis, 1998).



Para entender el proceso de secado, es necesario conocer las etapas que lo componen. La primera de ellas es el periodo de Evaporación Superficial o de Velocidad Constante, el cual se refiere a una humectación más o menos completa de la superficie de producto debido a la transferencia de materia (agua) del interior del material hacia su superficie. La masa de la materia transferida no tiene un valor significativo, dado que la cantidad y velocidad de agua que llega a la superficie es casi equivalente a la cantidad y velocidad con que ésta misma se evapora. Eso se mantendrá constante mientras la fuerza de aspiración de los capilares basten para traer rápidamente del interior la cantidad de agua equivalente a la que se volatilicen bajo las condiciones que imperan en el ambiente. Por otro lado, la temperatura de la superficie del material está determinada por la difusión simultánea del calor y de la materia, y con frecuencia se mantiene aproximadamente constante pero por encima de la temperatura límite de enfriamiento.

Cuando la parte interna del material deja de ser capaz de suministrar humedad a la superficie bajo las condiciones en las que el aire está vaporizando, se observa un descenso de la velocidad de secado. Este fenómeno se caracteriza por un acentuado punto de inflexión en la curva de secado. Debido a la insuficiencia de la aportación de humedad suministrada por el interior a la superficie del material, ésta no se moja por completo, por lo que aparecen emplazamientos secos y la velocidad de evaporación sobre la superficie disminuye considerablemente y de forma lineal con la humedad del producto. En este punto los sucesos físicos son diferentes a los de la primera etapa ya que la curva de los puntos de inflexión depende en esencia de las propiedades capilares del material, de la temperatura de secado y del coeficiente de conductividad de la humedad.

Ahora bien, en el segundo periodo de secado, las variaciones de la velocidad de secado dependen menos de la corriente de aire que actúa sobre la superficie que de la distribución de la humedad en el producto. La resistencia a la transferencia de materia entre la superficie y el aire que la rodea es despreciable con respecto a la resistencia mostrada en el interior, pues el transporte de humedad a la superficie es mucho más

difícil. Las fuerzas motrices de este transporte son las fuerzas capilares y de difusión que dependen de las propiedades del material.

En el caso de los materiales no higroscópicos de capilares gruesos, los emplazamientos emigran cada vez más hacia el interior del producto. La humedad evaporada se difunde en forma de vapor a través de los poros llenos de aire antes de que sea arrastrada al llegar a la superficie del producto por el desplazamiento sobre la superficie. Si el tiempo de secado es suficientemente largo, la sustancia puede alcanzar el porcentaje cero de humedad a poco que el medio desecante tenga una humedad relativa  $\phi < 1$ . Mientras que en el caso de los materiales higroscópicos la velocidad de secado decrece linealmente hasta mantenerse aparentemente constante. En tanto que la humedad no descienda en ninguna zona su valor de equilibrio, el material se comporta como no higroscópico. Cuando prosigue el secado, frecuentemente aparece un tercer periodo, muy claramente diferenciado de su predecesor, el cual empieza cuando se alcanza el grado de humedad higroscópica máximo en la zona más húmeda del producto. Según la isoterma de sorción, el grado de humedad corresponde a humedad relativa del aire  $\phi=1$ .

La velocidad de secado disminuye en este caso hasta el valor 0, que se alcanza para la humedad de equilibrio. De ello se deduce que los materiales higroscópicos no pueden secarse nunca por completo en el aire cuya tensión parcial del vapor es  $P_{vp}$  es  $> 0$ . Para los materiales higroscópicos no existe nivel de secado propiamente dicho que constituya un límite bien marcado entre una capa límite húmeda y una capa límite seca, sino por el contrario, son campos que comprenden diversos grados de humedad en los que impera una presión de equilibrio de vapor correspondiente a cada temperatura y a cada grado de humedad (Kneule, 1982).

## 8. Materiales y Metodología

El presente trabajo constó de cinco etapas para dar respuesta a la hipótesis planteada: cultivo de las microalgas, la concentración de la biomasa, el secado de la misma, la extracción del EOT (Extracto Orgánico Total) y el análisis de los ácidos grasos a través de un método cromatográfico.

### 8.1 Cultivo de las microalgas

Las microalgas utilizadas fueron *Scenedesmus sp* y *Neochloris oleoabundans*, por sus capacidades para producir lípidos según lo reportado por Garibay (2009) y Amaro (2010). Las cepas fueron adquiridas de la Unidad Profesional de Investigación Biotecnológica (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional.

#### 8.1.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

La cepa *Scenedesmus sp*. fue cultivada en el medio BG11 (Xin, 2010; Rippka, 1979) compuesto en g/L por:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2.86;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.81;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.222;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.079;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.390;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.0494;  $\text{NaNO}_3$ , 1.5;  $\text{MgSO}_4$ , 0.075;  $\text{CaCl}_2$ , 0.036; EDTA, 0.001;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.02; Ácido cítrico, 0.006; Citrato Férrico Amoniacal; 0.006;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.04.

Para la cepa *Neochloris oleoabundans* se utilizó el Medio Basal de Bold o BBM por sus siglas en inglés (Bold's Basal Medium) (Pruvost, 2009); su preparación consiste para un stock de 20 L en g/L:  $\text{NaNO}_3$ , 5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{NaCl}$ , 0.5,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.2284;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.0288;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1764;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.0314;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.02395;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.0098;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.5; EDTA, 1;  $\text{KOH}$ , 0.62;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0096 (En caso de precipitar agregar 0.2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

La cantidad de nitrógeno empleada en los dos medios de cultivos fue reducida en un 50%, ya que es reportado que la carencia de este nutriente promueve la producción de lípidos (Lin y Junda 2011; Hsieh, 2009).

### 8.1.3 Fotobiorreactores

Para el cultivo de las microalgas se armaron fotobiorreactores con garrafones de 10 L. de agua purificada comercial que fueron lavados y enjuagados con agua destilada. En las boquillas de los contenedores se colocaron tapones horadados, en los cuales se montaron tres tubos de vidrio que funcionaron como entrada y la salida de aire; y toma de muestra. (Fig. 5).

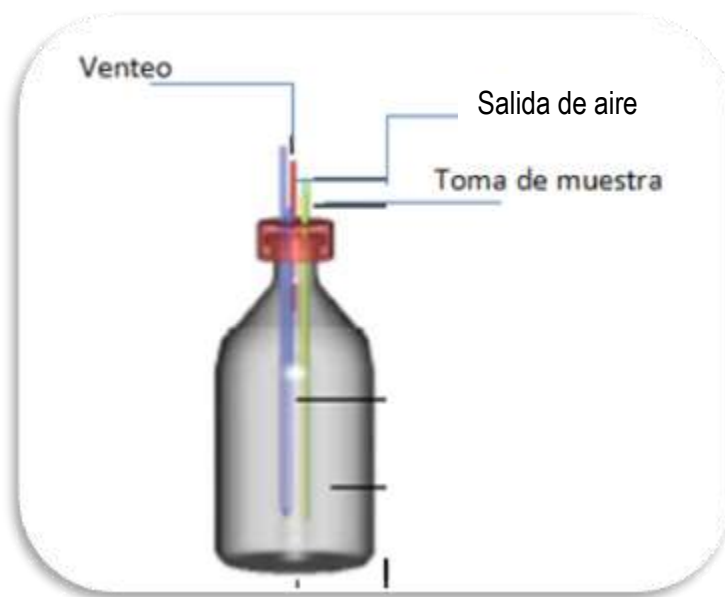


Figura 5. Esquema de un Fotobiorreactor de 10 L.

### 8.1.4 Inóculo

Para empezar la producción de biomasa de las dos microalgas en los fotobiorreactores de 10 L, se dispuso de 2 L de cultivo líquido, que fue depositado en el contenedor después de haber colocado 6 L de medio de cultivo, dando un volumen total de 8 L.

Los fotobiorreactores fueron expuestos a fotoperiodos luz y oscuridad (12:12 h) con una intensidad luminosa de 100 mMol/m<sup>2</sup>s, a una temperatura de 21°C (± 1°) y aeración constante durante 20 días.

#### **8.1.5 Determinación de biomasa: DO (Densidad Óptica) y PS (Peso Seco)**

El crecimiento de los cultivos fue monitoreado cada 36 horas por Densidad Óptica (DO) a 600 nm en un Espectrofotómetro Genesys G10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific. A través de observaciones al microscopio óptico a 60 y 100X se vigilaron las posibles contaminaciones que los cultivos pudieron haber presentado.

Para determinar el PS (Peso Seco) es decir, la cantidad de biomasa presente en las muestras, se pusieron a peso constante charolas de aluminio con membranas de fibra de vidrio marca AHSLTROM con tamaño de poro de 0.7µ. Posteriormente se tomaron 5 mL de los cultivos frescos y fueron filtrados con vacío empleando las membranas para que en ellas quedara la biomasa. Las charolas con las membranas fueron secadas en una estufa a 60°C durante 24 h, se enfriaron en un desecador y se tomó lectura de su peso. Finalmente, el PS se calculó por diferencia de pesos.

#### **8.2 Concentración de la biomasa**

La biomasa de los dos cultivos fue concentrada por medio de centrifugación a 7000 rpm en un tiempo de 15 min en un equipo Beckman Courter modelo J2-Mc Centrifuge. Posteriormente, la biomasa concentrada se depositó en recipientes de vidrio tapados y se

mantuvieron en refrigeración 4°C hasta que se dispusiera de ella para hacer las pruebas de secado en un tiempo no mayor de 3 días.

### **8.2.1 Determinación de contenido de agua en la biomasa concentrada**

El contenido de agua de la biomasa concentrada se determinó colocando 1g ( $\pm 0.1$ ) de la biomasa centrifugada en una charola de aluminio de 5 cm de diámetro (a peso constante). Posteriormente se secaron a 100°C durante 24 h. Finalmente el contenido de agua se calculó por diferencia de pesos.

### **8.3 Pruebas de secado de la biomasa de las microalgas**

Para las pruebas de secado de las dos microalgas se utilizó 1g ( $\pm 0.03$ ) de la biomasa concentrada, la cual fue colocada en una charola de plástico con tapa (a peso constante) y esparcido de tal forma que se tuviera un espesor aproximadamente de 1mm en un área de 12.56 cm<sup>2</sup>.

Las muestras fueron deshidratadas a cinco temperaturas (20, 40, 60, 80 y 100 °C) en un horno marca Riossa modelo H-41. Se tomó el peso de las muestras a diferentes intervalos de tiempo (12 h para 20°C, 60 min para 40°C, 15 min para 60°C, 10 min para 80°C y 8 min para 100°C) y se detuvo el proceso de secado hasta que las muestras reportaran un contenido de humedad final de 15% ( $\pm 5$ ). Es importante destacar que las tapas se emplearon únicamente para cubrir las muestras al momento de tomar lectura de su peso, en los intervalos de tiempo señalados.

Las cinéticas de secado se realizaron por triplicado, en cada una de ellas se secaron 3 muestras, por lo tanto, se tuvo un total de nueve muestras deshidratadas por cada temperatura.

## 8.4 Extracción de lípidos

Las extracciones de los lípidos presentes en las microalgas (muestra húmeda y biomasa seca) se realizaron bajo dos métodos: Soxhlet y Sonicación.

### 8.4.1 Extracción del Extracto Orgánico Total (EOT) por Soxhlet

Para este método se emplearon sobres de papel filtro lavados con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , donde se colocó 0.1 g ( $\pm 0.03$ ) de las muestras secas de cada una de las temperaturas de secado y 1 g de una muestra húmeda (testigo). En matraces bola (a peso constante) se dispusieron 185 ml de una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1 v/v), se montaron los dispositivos Soxhlet y la extracción se llevó a cabo durante 4 h. La mezcla de solventes se mantuvo a una temperatura de 45°C durante todo el proceso (Fig. 6).



**Figura 6. Equipo de extracción Soxhlet**

Al concluir la extracción, se recuperó el solvente en un rotavapor RE300 Yamato, junto con un baño de agua BM500 Yamato y con una bomba de vacío (Fig. 7). Los matraces sin solvente se dejaron enfriar en un desecador y se registró su peso.



**Figura 7. Rotavapor RE300 Yamato**

Finalmente, los matraces fueron lavados con 30 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para recobrar el EOT y la solución se depositó en viales ámbar de 40 mL puestos previamente a peso constante.

#### **8.4.2 Extracción del Extracto Orgánico Total (EOT) por Sonicación**

En matraces Erlenmeyer con 50 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se colocaron 0.06 g de muestras secas que fueron tratadas a 40 y 100°C. La extracción se llevó a cabo durante 1 h a 25°C en un equipo Fischer Scientific modelo FS 36H. Posteriormente, la muestra sonicada se colocó en un embudo de separación (Fig. 8) y se dejó reposar hasta que se vieran dos fases: Orgánica (FO) y la Acuosa (FA). La FO se recuperó en tubos de ensaye, se le agregó 0.5g  $\text{MgSO}_4$  para absorber el exceso de humedad durante un tiempo de 24 h. Posteriormente el  $\text{MgSO}_4$  fue retirado mediante filtración y se dispuso a almacenar las muestras en viales para su posterior metilación.





**Figura 8. Embudo de separación con las Fases orgánica y acuosa**

Las muestras húmedas fueron también sometidas a extracción de lípidos por este método, sin embargo fueron bajo dos condiciones: hidrólisis ácida y sin hidrólisis.

Para la hidrólisis ácida, se pesó 1.5 g de la muestra y fue dispuesta en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de HCl 0.1 N. Se sonicó durante 1h y 25°C, posteriormente se agregó 50 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se repitió la sonicación a las mismas condiciones. Al finalizar la muestra se llevó a agitación mecánica durante 15 min. La recuperación de la Fase Orgánica se hizo mediante un embudo de separación, se le agregó 0.5 g de MgSO<sub>4</sub> para retirar el exceso de humedad. Finalmente la muestra se filtró, se almacenó en viales para después metilarla.

Para la Sonicación de las muestras sin hidrólisis, se utilizó 1.5 g de muestra húmeda y se llevó a cabo la extracción como se realizó con las muestras secas a las temperaturas de 40 y 100°C previamente descrito.

#### **8.4.3 Metilación**

La metilación de los ácidos grasos presentes en las dos microalgas se hizo tomando una muestra de cada tratamiento térmico cuyo EOT se obtuvo por Soxhlet; una muestra húmeda, una deshidratada a 40°C, otra a 100°C y una muestra húmeda tratada con HCl donde los EOT se recabaron por Sonicación.

Los EOT fueron filtrados con tierras diatomeas y carbón activado para eliminar compuestos como clorofilas. Se depositó 5 mL de cada extracto en viales pequeños, se le quitó el solvente ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) a través de la evaporación con aire. Posteriormente el vial fue enjuagado con 6 mL de  $\text{CH}_3\text{OH}$ , el cual junto con el EOT fueron depositados en un matraz bola con 1 mL de  $\text{BF}_3$ . La reacción de metilación se llevó a cabo con agitación continua a una temperatura de  $80^\circ\text{C}$  durante 20 min. Para evitar la evaporación del  $\text{CH}_3\text{OH}$ , se utilizó un sistema de recirculación con agua fría (Fig. 9). Posteriormente se añadió al EOT metilado 2 mL de agua destilada y 2 mL de  $\text{C}_6\text{H}_6$  (Hexano) y fue dispuesta en un embudo de separación; se agito, se dejó en reposo para separar la Fase Orgánica; se le agregó 0.5 g de  $\text{MgSO}_4$  para quitar el exceso de humedad. Finalmente las fases orgánicas fueron filtradas, almacenadas en viales y llevadas al análisis cromatográfico.



**Figura 9. Calentamiento del matraz con  $\text{CH}_3\text{OH}$  y  $\text{BF}_3$  durante la metilación**

### **8.5 Análisis de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases – masas (GC -MS)**

Los análisis cromatográficos de las muestras se hicieron en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 600 (Fig. 10) con una columna ELITE 5MS con una longitud de 30 m.

con diámetro de 32 mm y film de 0.25  $\mu$ . El gas acarreador fue He con un flujo de 0.8 mL/min. Se empleó una rampa de temperatura de 60°C, 3 min; 240°C, 30°/min; 240°C, 10 min. La muestra empleada fue 0.5  $\mu$ L, en un proceso que duró 19 min.

Los análisis de masas se hicieron en un Espectrometro de Masas Perkin Elmer Clarus 600 T, con una energía de ionización de 70 eV, a una temperatura de 150°C y analizando los iones positivos de masa de 25 a 400.



**Figura 10. Cromatógrafo de Gases-Masas**

## 9. Resultados y Discusión

### 9.1 Cinéticas de Secado de *N. oleoabundans*

Las curvas de secado a las diferentes temperaturas (40, 60, 80 y 100°C) sobre la microalga *N. oleoabundans* muestran dos fases, la primera correspondió al periodo de velocidad constante, y la segunda al periodo de velocidad decreciente, la cual se manifestó con el cambio en las pendientes de las curvas (Fig. 11). Estos fenómenos son reportados de una manera similar como lo hace Geankoplis (1998).

Para describir el comportamiento del fenómeno de secado en *N. oleoabundans* es importante hacer notar que después de haber concentrado su biomasa quedaron remanentes de medio de cultivo (Fig. 13a). Por ello, se puede suponer que en la primera etapa de la deshidratación se manifestó con un fenómeno de evaporación de los restos de medio de cultivo, lo que ocasionó que los espacios entre las células de esta microalga se redujeran y fue entonces que comenzaron cambios estructurales y químicos (Fig. 13b y c).

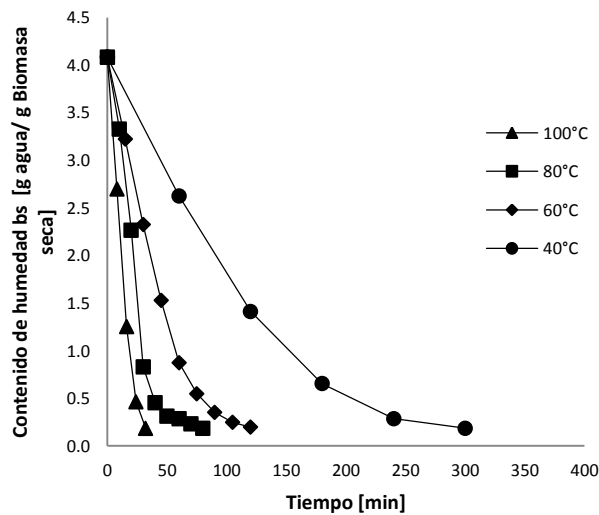


Figura 11. Curvas de secado a diferentes temperaturas en *N. oleoabundans*

La primera fase de los tratamientos térmicos duró aproximadamente la mitad del tiempo que duró todo el proceso del secado. Los valores reportados de la humedad crítica en *N. oleoabundans* oscilaron entre 0.83 y 1.41 g agua/g biomasa seca para las diferentes temperaturas. Tomando en cuenta que el contenido de agua inicial en esta microalga fue de 4.08 g agua/ g biomasa seco, se perdió aproximadamente un 50% del agua presente en la primera fase de los tratamientos térmicos (Tabla 2). De acuerdo con Lopes *et al.*, (2007) y Kneule (1982), en esta fase de la deshidratación se presentan cambios importantes en los materiales con alto contenido de agua, como el colapso estructural o contracción debido a la gran cantidad de líquido evaporado.

**Tabla 2. Caracterización de los tratamientos térmicos sobre *N. oleoabundans***

Ts [°C]	Tc [min]	Xc [g agua/ g sólido seco]	Ap [%]	R [g agua/cm <sup>2</sup> min]	Tt [min]	Xe [g agua/g sólido seco]	Xe [%]
20	-	-	-	-	2280	0.17	13.34
40	120	1.41	42.38	0.0003	300	0.18	15.43
60	60	0.87	54.88	0.0007	120	0.20	16.37
80	30	0.83	55.11	0.0023	80	0.18	15.49
100	16	1.25	44.43	0.0029	32	0.18	15.43

Ts: Temperatura de secado; Tc: tiempo crítico; Xc: Humedad crítica; Ap: agua perdida en Tc; R: velocidad de secado en Tc, Tt: tiempo de secado, Xe: Humedad de equilibrio.

Los valores de la velocidad de secado de *N. oleoabundans* en esta primera fase fueron afectados por la temperatura, ya que en los tratamientos térmicos bajos, la velocidad también fue baja. Esto significa que la cantidad de agua que se evaporó estuvo en función de la temperatura, lo que tuvo un impacto en el tiempo que tardaron las cinéticas. Los contenidos de agua final para los diferentes tratamientos térmicos fueron aproximadamente del 15% (Tabla 2). Estos datos son aceptables para algunas normas de calidad en alimentos, Vega-Galvez *et al.*, (2007) reportan que este porcentaje cumple con leyes chilenas en la materia. Sin embargo no se encontraron reportes de especificaciones en normas mexicanas.

## 9.2 Cinéticas de Secado de *Scenedesmus sp.*

Las curvas de secado de los diferentes tratamientos térmicos en *Scenedesmus sp.* evidenciaron al igual que las de *N. oleoabundans* dos fases durante todo el proceso de secado (Fig.12), las de velocidad constante y decreciente.

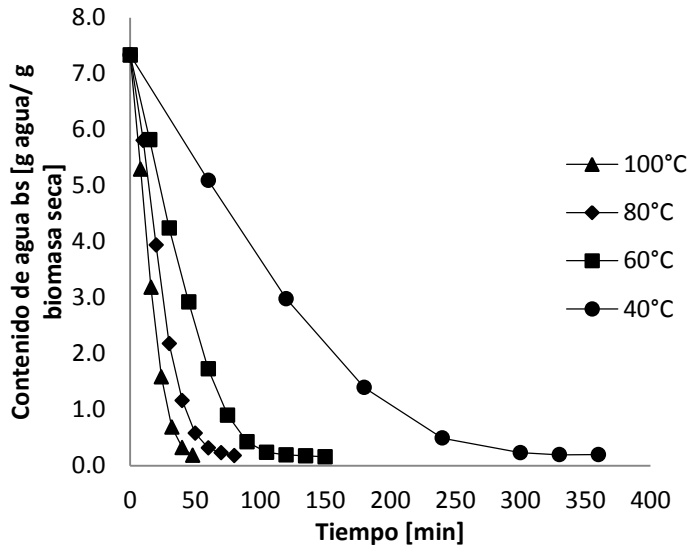


Figura 12. Curvas de secado a diferentes temperaturas en *Scenedesmus sp.*

En la primera fase, la humedad crítica en los diferentes tratamientos térmicos estuvo en un rango entre 1.39 y 3.18 g agua/g biomasa seca, lo que representó aproximadamente una pérdida de agua del 38% del total de agua contenida en el material húmedo (7.34 g agua/g biomasa seca, equivalente a 88%). El tiempo que duró esta primera fase fue aproximadamente la mitad del tiempo de todas las cinéticas (Tabla 3).

La temperatura del secado en *Scenedesmus sp.* tuvo una influencia directa con la velocidad de secado y con el tiempo, ya que al aumentar la temperatura, la cantidad de agua evaporada al ambiente fue mayor, pero el tiempo que duraron las cinéticas fue menor.

**Tabla 3. Caracterización de los tratamientos térmicos sobre *Scenedesmus sp.***

Ts [°C]	Tc [min]	Xc [g agua/ g sólido seco]	Ap [%]	R [g agua/cm2 min]	Tt [min]	Xe [g agua/g sólido seco]	Xe [%]
<b>20</b>	-	-	-	-	2880	0.17	14.75
<b>40</b>	180	1.39	46	0.0003	360	0.20	16.51
<b>60</b>	60	1.72	39	0.0008	150	0.16	13.63
<b>80</b>	30	2.17	40	0.0017	80	0.18	14.75
<b>100</b>	16	3.18	25	0.0026	48	0.18	13.63

Ts: Temperatura de secado; Tc: tiempo crítico; Xc: Humedad crítica; Ap: agua perdida en Tc; R: velocidad de secado en Tc, Tt: tiempo de secado, Xe: Humedad de equilibrio.

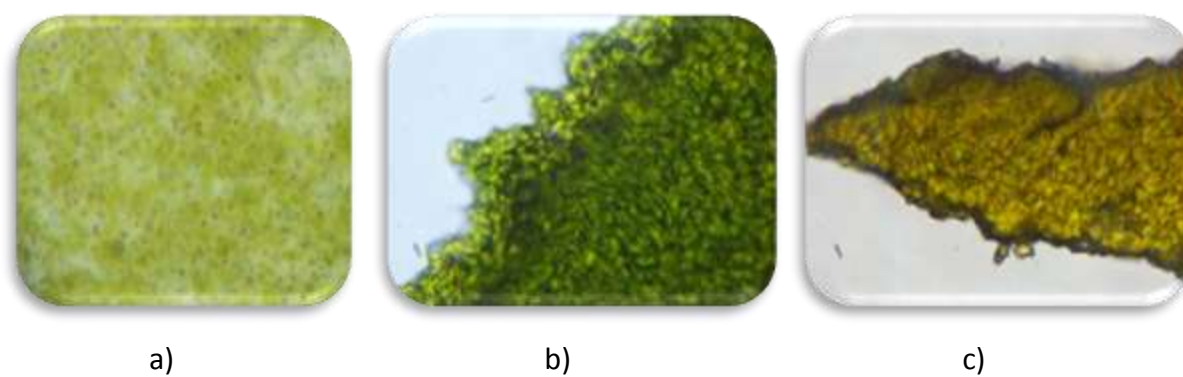
Los fenómenos que se presentaron en los diferentes tratamientos térmicos en *Scenedesmus sp.* son muy similares a los de *N. oleoabundans*, es decir, lo primero que se evaporó en *Scenedesmus sp.* fueron los remanentes del medio de cultivo que quedaron después de la centrifugación, posteriormente se llevó a cabo una reducción de los espacios entre células y éstas experimentaron cambios físicos y químicos.

Los comportamientos mostrados por estas dos microalgas son similares a comportamientos presentados a otras microalgas: *Gracilaria chilensis* (Vega-Gálvez, 2007) y *Aphanotece microscópica Nägeli* (Lopes *et al.*, 2007). En ambos estudios se evidenció una clara relación de la temperatura con la velocidad de secado, mostrándose en el aumento de las pendientes de las curvas de secado al aumentar la temperatura de los tratamientos, y la velocidad decreciente (segunda fase de la deshidratación) se manifestó con una tendencia exponencial de las curvas provocada por el cambio de pendiente. Cabe destacar también que la mayor parte del fenómeno de secado ocurrió al inicio de la segunda etapa de secado, ya que en ésta se eliminó la mayor cantidad de agua presente en las microalgas (Dissa, *et al.*, 2010).

### 9.3 Efecto de la temperatura de secado en las características físicas de *N. oleoabundans* y *Scenedesmus sp.*

Las muestras húmedas de las dos microalgas y de cada tratamiento fueron observadas en un microscopio óptico (100X) para evaluar las condiciones físicas que presentaron antes y después de las cinéticas de secado. En las muestras húmedas se observó que las células de las microalgas tenían movilidad, aunque en espacios reducidos por los remanentes de los medios de cultivo que no se eliminaron después de la centrifugación (Fig. 13a).

Por otro lado, las muestras de las microalgas que fueron deshidratadas sufrieron cambios físicos. En primer lugar, la biomasa formó placas o láminas brillantes que al momento de retirarlas de las charolas de plástico en los las cinéticas de 60°, 80° y 100°C se desprendieron completamente con la ayuda de unas pinzas o incluso sin la necesidad de algún instrumento. No sucedió lo mismo a las temperaturas de 20 y 40°C, ya que fue necesario el uso de una espátula para retirar la muestra adherida al molde, sobre todo a 20°C, donde incluso fue necesario raspar. En segundo lugar, presentaron una coloración verde oscuro para el tratamiento a 20°C (Fig. 13b) y café-marrón para los tratamientos restantes (Fig. 13c). Las muestras también presentaron un olor característico, que se hizo más fuerte con el aumento de las temperaturas de secado. Vistas al microscopio, las muestras que se secaron a 20°C presentaron una aglomeración de células, y las muestras secadas a 40, 60, 80 y 100°C mostraron además un rompimiento celular.



**Figura 13. Aspectos físicos de las microalgas al efecto térmico: a) húmeda, b) 20°C, c) 100°C**



Estos cambios sufridos en las microalgas se dan en función de los compuestos orgánicos que contienen. Se sabe que estos microorganismos son ricos en proteínas, aminoácidos, carbohidratos (almidones, azúcares y otros polisacáridos), ácidos grasos, vitaminas, pigmentos (clorofilas, carotenoides), ficobiliproteínas (Spolaore, *et al.*, 2006), minerales (Aguilera Morales, *et al.*, 2005) y compuestos fenólicos (Tello-Ireland, *et al.*, 2011); por lo que al ser sometidos a tratamientos térmicos sufren degradaciones o se generan otros compuestos a consecuencia de reacciones químicas.

Los cambios de color y la presencia de olor pudieron haberse producido por reacciones no enzimáticas, concretamente a reacciones de Maillard y a los cambios que los pigmentos pudieron sufrir con el tratamiento térmico, además de un cambio de pH, la presencia de oxígeno, metales y fosfatos. La velocidad de pardeamiento (oscurecimiento) es alta a bajos contenido de agua y está en función de la temperatura. En el caso de alimentos o materiales que contienen glucosa, el aumento del pardeamiento puede ser de cinco a seis veces por cada 10°C de aumento (Barbosa y Vega, 2000; Tello-Ireland, *et al.*, 2011). Es por ello, que las muestras que tuvieron efecto térmico medio y elevado (40, 60, 80 y 100°C) presentaron un color marrón a comparación de la muestra que fue secada a temperatura ambiente (20°C).

Los cambios estructurales que las microalgas evidenciaron fueron: una formación de placas y un endurecimiento de éstas a pesar de que se mostraron quebradizas. Estos fenómenos se causaron posiblemente por la cristalización de polisacáridos, principalmente almidones debido a la pérdida de agua y a la integración celular. También se presentó un encogimiento o contracción del material, recordando que el espesor inicial de las muestras fue de 1mm, las placas no tuvieron este mismo espesor. Este fenómeno se presentó principalmente en la primera etapa del secado y está relacionado con las altas temperaturas (60, 80 y 100°C), con la cantidad de agua transferida al aire caliente y con el tiempo de secado (Dissa, *et al.*, 2010), mientras que con las bajas temperaturas (20 y

40°C) se provocó un aumento en la porosidad y una contracción reducida, por efecto del tiempo de deshidratación (Barbosa y Vega, 2000).

En cuanto a los efectos que los ácidos grasos pudieron sufrir por los tratamientos térmicos se encuentra una posible oxidación lipídica, acentuada con la temperatura, y cuya velocidad de oxidación depende además de los tipos, el número, la posición y la geometría de los dobles enlaces de los ácidos grasos y de la presencia de oxígeno (Fannema, 1996). Los ácidos grasos con insaturaciones de tipo *cis* son los más susceptibles. Las oxidaciones lipídicas favorecen la presencia de olores y cambios de color en la muestras, como reportan Miranda *et al.*, (2009) en Aloe Vera y Jayathilakan *et al.*, (2005) en carnes.

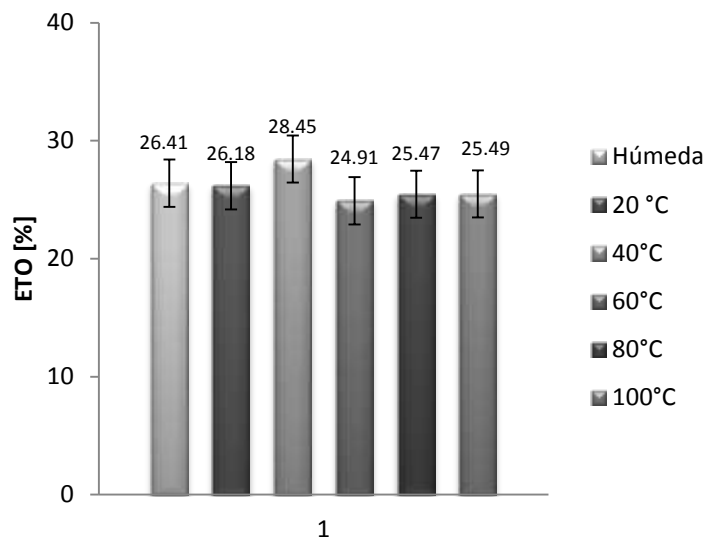
#### **9.4 Extracción de lípidos**

Los lípidos contenidos en las dos diferentes algas secas (§ 8.7; 9.1) fueron extraídos empleando dos técnicas diferentes: Soxhlet y Sonicación.

##### **9.4.1 Extracción de lípidos por el método Soxhlet**

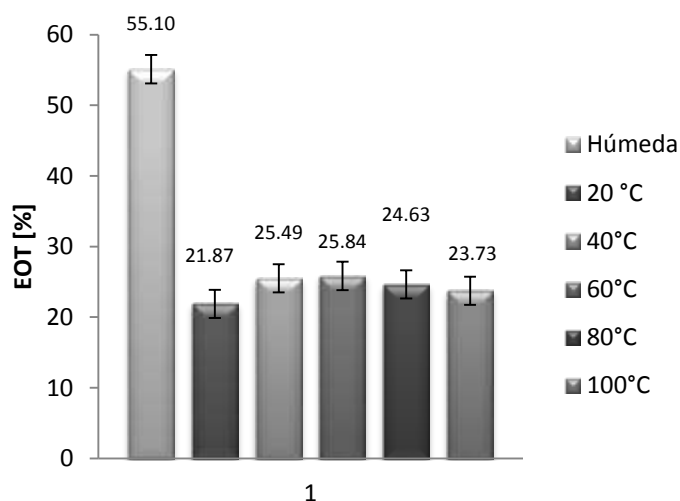
Los Extractos Orgánicos Totales (EOT) obtenidos por esta técnica mostraron una pigmentación marcada: de color verde oscuro para el caso de *Scenedesmus sp.* y de color café-marrón para *N. oleoabundans*.

Los ETOs obtenidos de *N. oleoabundans* en los diferentes tratamientos térmicos estuvieron en un rango de 24.91 y 28.45%. Para comparar estos porcentajes se contrastó con una muestra húmeda (§ 8.4.1); obteniéndose un porcentaje de 26.41% [g ETO/g sólido seco] (Fig. 14). El rendimiento de este proceso fue del 99.02%, lo que indica que se extrajo una cantidad alta de componentes.



**Figura 14. Porcentaje de ETO recuperado de *N. oleoabundans***

En el caso de *Scenedesmus sp.*, los porcentajes de ETO recuperados de las muestras sometidas a los diferentes tratamientos térmicos oscilaron entre 21.87 y 25.84%. Mientras que de la muestra húmeda se obtuvo un 55.10% (Fig. 15). El rendimiento en estas extracciones fue de 53.44%, el cual es pobre comparado con el de *N. oleoabundans*.



**Figura 15. Porcentaje de ETO recuperado de *Scenedesmus sp.***

La mezcla de solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$  (2:1v/v) empleada para las extracciones de lípidos por Soxhlet tuvo una polaridad baja ( $\epsilon = 12.79$ ) por lo que los lípidos que se pudieron extraer en su mayoría son: triglicéridos, ceras, esteroides y fosfolípidos, acompañados además de algunos compuestos con los que guardan relaciones funcionales como ésteres y amidas.

Se mencionó anteriormente que los extractos presentaron una coloración lo que indica que no se puede descartar la posibilidad de incluir en los EOT a compuestos que tienen poca relación funcional o estructural con los lípidos, por ejemplo: esteroides, vitaminas liposolubles, pigmentos, carotenoides y terpenos, como lo reporta Rodríguez, *et al.*, (2007).

Por otro lado, los porcentajes de los ETO obtenidos de las dos microalgas muestran que no hay una diferencia con relación a la temperatura de secado, esto en una forma cuantitativa (Figs. 14 y 15).

#### **9.4.2 Método de Sonicación**

El objetivo que tuvo hacer extracciones por el método de Sonicación o Ultrasonido fue el de hacer una comparación cualitativa con los extractos del método Soxhlet, a través de la cromatografía de gases-masas de los ácidos grasos presentes en las muestras deshidratadas a diferentes temperaturas. No se hizo un análisis gravimétrico del ETO debido a que la cantidad de muestra empleada en la Sonicación fue muy pequeña (0.06 g) comparada con el método Soxhlet (1 g).

Bajo el método de extracción por Sonicación se analizaron dos temperaturas (40 y 100°C) con el propósito de ver si hay un efecto de la temperatura sobre los diferentes ácidos

grasos presentes en la muestras; además se hizo uso de una muestra húmeda como testigo.

Al llevar a cabo las extracciones por Sonicación los extractos también presentaron una tonalidad semejante a las presentadas por las microalgas en el método Soxhlet, excepto las muestras frescas que no se disolvieron en el solvente (Fig. 16).

El solvente empleado en estas pruebas fue el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , cuya polaridad fue baja ( $\epsilon = 9.08$ ) por lo tanto se pudieron haber extraído el ETO con que con el método Soxhlet (§ 9.4.1).



**Figura 16. Coloraciones en las microalgas después de la Sonicación. (De izq a derecha: *N. oleoabundas* a 40°C, *N. oleoabundans* a 100°C, *Scenedesmus sp.* a 40°C, *Scenedesmus sp.* a 100°C, Mtra fresca de *N. oleoabundans*)**

El rendimiento cuantitativo de las extracciones por el método de Sonicación es según se reporta, de alrededor del 80% comparándolo con el método Soxhlet. La ventaja que presenta la Sonicación se ve reflejada en los tiempos de extracción y en el consumo de solventes (§ 8.4.2; Kou y Mitra, 2003).

## 9.5 Comparación cualitativa de los ácidos grasos presentes en *N. oleoabundans* y *Scenedesmus sp.* extraídos por los métodos Soxhlet y Sonicación.

### 9.5.1 Comparación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos presentes en *N. oleoabundans*

Por medio del análisis cromatográfico se determinó el tipo y cantidad de ácidos grasos que estuvieron presentes en las muestras húmedas y en los tratamientos térmicos sobre *N. oleoabundans* y se compararon en función del método de extracción.

Con respecto de las extracciones Soxhlet, los ácidos grasos que se encontraron fueron tres: ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), el ácido oleico ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) y el ácido esteárico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ; Tabla 4).

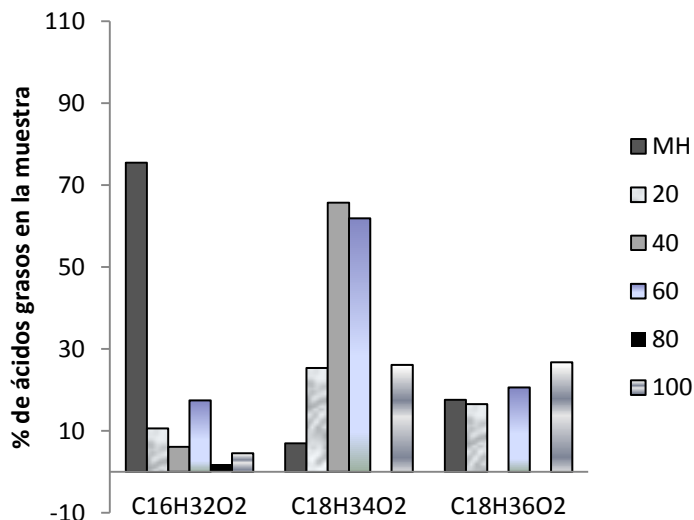
**Tabla 4. Ácidos grasos obtenidos por el método Soxhlet en *N. oleoabundans***

AG	PM	MH	TS [°C]					GI	Ref	NC
			20	40	60	80	100			
$C_{16}H_{32}O_2$	256	75.43	10.63	6.13	17.47	1.85	4.57	1	Tornabene et. al., (1983)	ácido palmítico
$C_{18}H_{34}O_2$	282	6.96	25.38	65.66	61.9	98.15 (mz)	26.13	2	Tornabene et. al., (1983)	ácido oleico
$C_{18}H_{36}O_2$	284	17.61	16.56		20.63		26.77	1	Tornabene et. al., (1983)	ácido esteárico
Extracto Total		<b>100</b>	<b>52.57</b>	<b>71.79</b>	<b>100</b>	<b>1.85</b>	<b>57.47</b>			

AG: ácido graso; PM: Peso molecular; MH: muestra húmeda; TS: Temperatura de Secado; GI: Grado de insaturación; NC: nombre común; mz: mezcla

El ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) estuvo presente en todos los tratamientos térmicos, teniendo el mayor porcentaje en la muestra húmeda (75.43%) y el menor a 80°C con

1.85%. Para el ácido oleico, se recuperó en la muestra húmeda sólo un 6.96%, mientras que a la temperatura de 40°C se extrajo un 65.66% pero no estuvo presente en el tratamiento de los 80°C. Finalmente para el ácido esteárico, se obtuvo un 17.61% para la muestra fresca y un 26.77% para la muestra de 100°C pero no estuvo presente en los tratamientos de 40 ni 80°C (Fig. 17).



**Figura 17. Porcentajes de ácidos grasos en *N. oleoabundans* extraídos por Soxhlet**

Tomando en cuenta los porcentajes totales de extracción de los ácidos grasos por Soxhlet sobre *N. oleoabundans* se observó que no hubo un efecto de la temperatura de 60°C con respecto a la muestra húmeda, en contraste, a 80°C se recuperó solo un 1.85% mientras que a 20 y 100°C se recuperaron las mismas cantidades (57.57 y 57.47% respectivamente; Fig. 18).

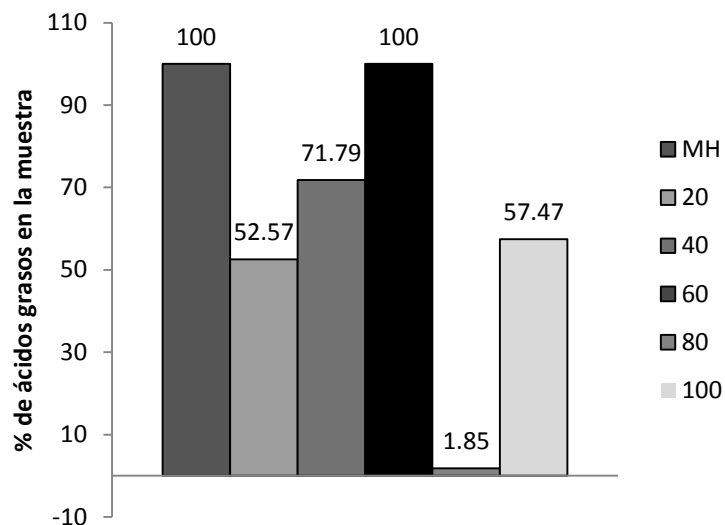


Figura 18. Extracciones totales por Soxhlet en *N. oleoabundans*

Para el caso de *Scendesmus sp.* las extracciones por Sonicación mostraron que se recuperó un número mayor de ácidos grasos que con el método Soxhlet. Se recuperó ácido mirístico ( $C_{14}H_{28}O_2$ ), 1 propil, 7, 10, 13, 16 docotetraeonato ( $C_{25}H_{42}O_2$ ) que es un ácido graso con insaturaciones de tipo *cis*, el ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), el ácido nervórico ( $C_{24}H_{46}O_2$ ), el ácido oleico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ), el ácido esteárico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ) y finalmente el ácido lignocénico (Tabla 5).

Tabla 5. Ácidos grasos obtenidos por el método Sonicación en *N. oleoabundans*

AG	PM	MH	TS [°C]		GI	Ref	NC
			40	100			
$C_{14}H_{28}O_2$	228	10.77	1.61		1	Tornabene et. al., (1983)	ácido mirístico
$C_{25}H_{42}O_2$	374		15.5		5		1 propil 7,10,13,16 docosatetraeonato
$C_{16}H_{32}O_2$	256	33.75	16.5	56.65	1	Tornabene et. al., (1983), Levine et. al., (2010)	ácido palmítico
$C_{24}H_{46}O_2$	366		20		2		ácido nervórico



$C_{18}H_{34}O_2$	282		17.03	2	Tornabene et. al., (1983), Levine et. al., (2010)	ácido oleico
$C_{18}H_{36}O_2$	284	55.49	4.05	1	Tornabene et. al., (1983), Levine et. al., (2010)	ácido esteárico
$C_{24}H_{48}O_2$	378		25.32	1		ácido lignocénico
Extracción Total		100	100	56.65		

AG: ácido graso; PM: Peso molecular; MH: muestra húmeda; TS: Temperatura de Secado; GI: Grado de insaturación; NC: nombre común.

En cuanto al efecto térmico presentado sobre los diferentes ácidos grasos que fueron extraídos por Sonicación, se encontró la presencia de ácido mistérico ( $C_{14}H_{28}O_2$ ) con un 10.77% en la muestra húmeda pero no a los 100°C. El compuesto 1 propil, 7, 10, 13, 16 docotetraeonato ( $C_{25}H_{42}O_2$ ) sólo se encontró en las muestras tratadas a 40°C; el ácido palmítico ( $C_{16}H_{34}O_2$ ) estuvo presente en todas las muestras, reportando un porcentaje más alto en los tratamientos de 100°C (56.55%) y el más bajo a 40°C. El ácido nervórico estuvo únicamente presente en las muestras de 40°C (20%), al igual que el ácido oleico (17.03%); el ácido esteárico se recuperó en la muestra húmeda (55.49%) y en 40°C. Finalmente, el ácido lignocénico ( $C_{24}H_{48}O_2$ ) tuvo presencia en los tratamientos térmicos de 40°C con un 25.32% (Fig. 19).

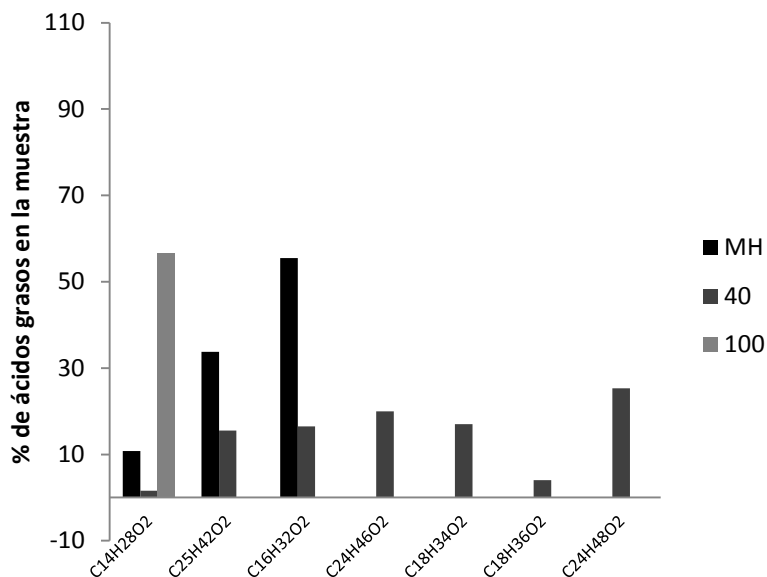


Figura 19. Porcentajes de ácidos grasos en *N. oleoabundans* extraídos por Sonicación

Obteniendo los porcentajes totales de los ácidos grasos obtenidos por Sonicación en *N. oleoabundans* se muestra que no hay una diferencia entre las muestras húmedas y deshidratadas en 40°C (Fig. 20).

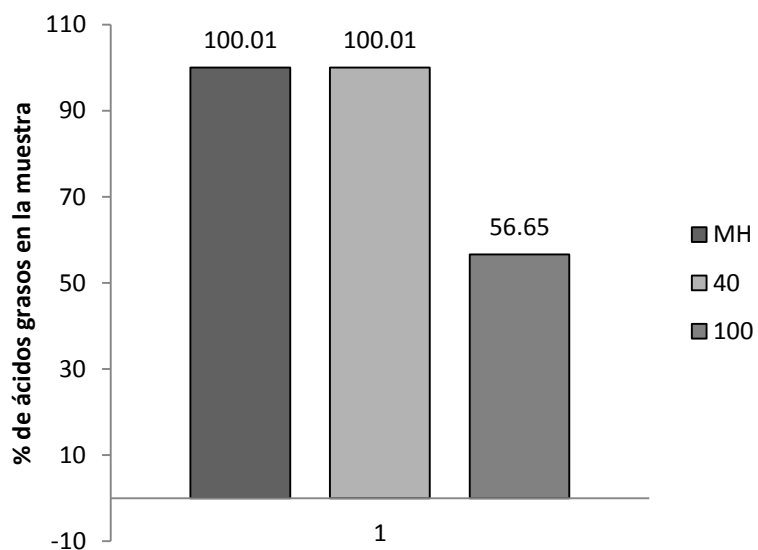


Figura 20. Extracciones totales por Sonicación en *N. oleoabundans*

Estos datos muestran que existe un efecto físico y químico de la temperatura sobre los ácidos grasos presentes en *N. oleoabundans* debido a las características particulares de estos compuestos, principalmente las insaturaciones. Pero también hay una influencia del método de extracción sobre la cantidad de ácidos grasos recuperados, el método de extracción por Sonicación permitió recuperar más compuestos que el método Soxhlet; esto se debió probablemente, a que las vibraciones ultrasónicas tienen un mayor contacto con el material, lo que provoca que haya un contacto mayor del solvente con los ácidos grasos a extraer.

Entre los cambios químicos que pudieron haber sufrido los ácidos grasos por acción de la temperatura encontramos una autooxidación sobre todo en los ácidos grasos insaturados porque necesitan más tiempo para absorber la misma cantidad de oxígeno que los ácidos grasos saturados. Comúnmente se presenta en materiales con contenido de ácidos esteárico, oleico, linoleico y linolénico. Este proceso de oxidación produce peróxidos y el sabor rancio, por ejemplo en alimentos.

### 9.5.2 Comparación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos presentes en *Scenedesmus sp.*

Los ácidos grasos recuperados por medio del método Soxhlet en la microalga *Scenedesmus sp.* son el ácido palmítico, el ácido oleico, el ácido esteárico y el ácido behéico (Tabla 6).

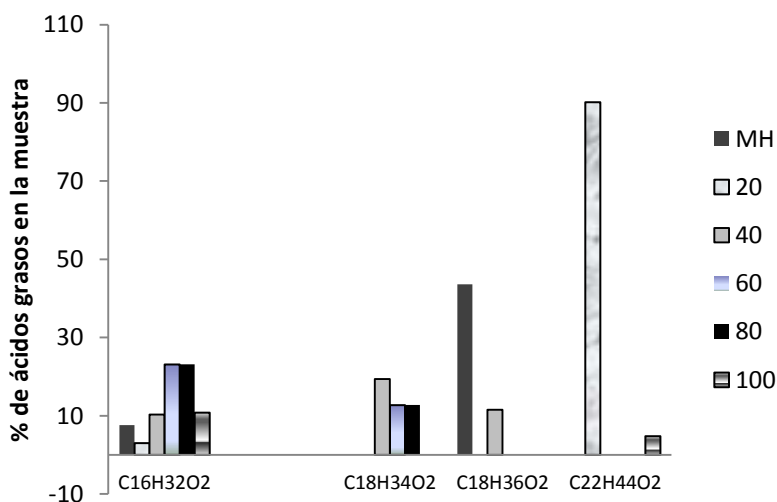
**Tabla 6. Ácidos grasos obtenidos por el método Soxhlet en *Scenedesmus sp.***

AG	PM	MH	TS [°C]					GI	REF	NC
			20	40	60	80	100			
C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	7.61	3.01	10.3	23.12	23.12	10.8	1	Shih- Hsin Ho, <i>et. al.</i> , (2010)	ácido palmítico
C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282			19.41	12.72	12.72		2	Shih- Hsin Ho, <i>et. al.</i> , (2010)	ácido oleico

$C_{18}H_{36}O_2$	284	43.6	11.49				1	Shih- Hsin Ho, <i>et. al.</i> , (2010)	ácido esteárico
$C_{22}H_{44}O_2$	340	90.17				4.78	1		ácido beheico
Extracción total	51.2	93.18	41.2	35.84	35.84	15.6			

AG: ácido graso; PM: Peso molecular; MH: muestra húmeda; TS: Temperatura de Secado; GI: Grado de insaturación; NC: nombre común.

El ácido palmítico estuvo presente en todos los tratamientos térmicos, pero los mayores porcentajes de recuperación fueron a los 60 y 80°C (23.12%). El ácido oleico se encontró en las cinéticas de 40°C con un 19.41% y no hubo una diferencia en 60 y 80°C (12.72%); el ácido esteárico apareció en la muestra húmeda (43.6%) y en la cinética de 40°C; finalmente, el ácido beheico se presentó en los tratamientos de 20°C (90.17%) y 100°C (4.18%; Fig. 21).



**Figura 21. Porcentajes de ácidos grasos en *Scenedesmus sp.* extraídos por Soxhlet**

La recuperación total de los ácidos grasos en todos los tratamientos térmicos fue mayor en la cinética de secado de 20°C, mostrando un porcentaje de 93.18% y la más baja a 100°C con un 15.58%.

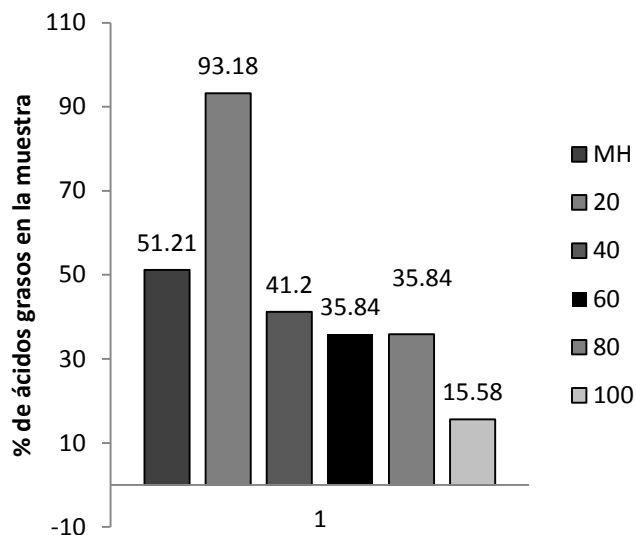


Figura 22. Extracciones totales por Soxhlet en *Scenedesmus sp.*

Los ácidos grasos recuperados por medio del método de Sonicación únicamente fueron dos: ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) y metil, 6,9,12,15 hexadecatetraonato ( $C_{17}H_{26}O_2$ ) en las muestras húmedas. En el tratamiento térmico de 40°C hubo presencia del ácido palmítico, sin embargo su cuantificación no fue posible, debido a que se encontró mezclado con otros compuestos (Tabla 7).

Tabla 7. Ácidos grasos obtenidos por el método Sonicación en *Scenedesmus sp.*

AG	PM	MH	TS [°C]		GI	REF	NC
			40	100			
$C_{17}H_{26}O_2$	262	22.02	-	-	4		metil, 6,9,12,15 hexadecatetraonato
$C_{16}H_{32}O_2$	256	77.08	(mz)	-	1	Shih- Hsin Ho, <i>et. al.</i> , (2010)	ácido palmítico
Extracción total		<b>99.1</b>					

AG: ácido graso; PM: Peso molecular; MH: muestra húmeda; TS: Temperatura de Secado; GI: Grado de insaturación; NC: nombre común; mz: mezcla

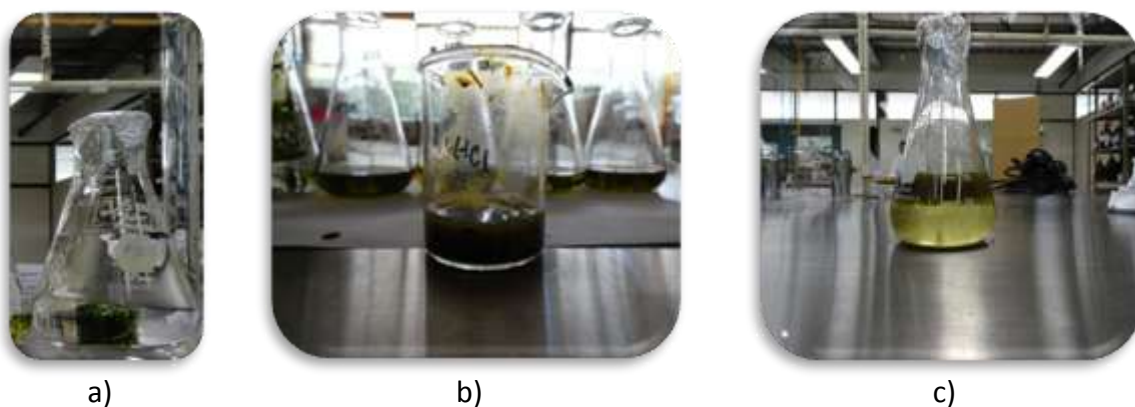
Los ácidos grasos recuperados bajo los dos métodos de extracción para la microalga *Scenedesmus sp.* fueron diferentes (Tablas 6 y 7). En este caso, donde se recuperó un menor tipo y por ende cantidad, fue bajo el método de Sonicación con dos compuestos, mientras que con Soxhlet se recuperaron cuatro. Un dato interesante es que estos recobros coincidieron únicamente en con el ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), siendo más la cantidad recuperada en la Sonicación (77.02%) que en Soxhlet (7.61%; Tablas 6 y 7).

Se observó un efecto de la temperatura de secado sobre los ácidos grasos bajo las dos técnicas de extracción. En el método Soxhlet el efecto se mostró en relación a la temperatura de secado siendo menor la cantidad de lípidos mientras la temperatura aumentó, aunque hubo la misma suma en las temperaturas de 60 y 80°C. La muestra húmeda presentó un porcentaje menor al tratamiento a 20°C, esto posiblemente tuvo una relación con el rendimiento de la extracción bajo este método sobre estas muestras (55.10%; Fig. 15). Un efecto similar se presentó bajo el método de Sonicación, pues en el tratamiento térmico de 100°C no se obtuvo ningún ácido graso, pero si los hubo en las muestras húmedas (Tabla 7).

Por otro lado, analizando a las dos microalgas (*N. oleoabundans* y *Scenedesmus sp.*), los ácidos grasos recuperados entre ellas fueron diferentes, oscilaron principalmente entre los 12 y 22 carbonos. Únicamente tuvieron una coincidencia con el ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) que se recuperó bajo los dos métodos, pero con porcentajes diferentes que estuvieron en función de la temperatura de secado de las muestras. En segundo lugar estuvieron presentes el ácido oleico ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) y el linoleico ( $C_{18}H_{32}O_2$ ) que son lo que se encuentran principalmente en las microalgas verdes (Gouviera y Oliveira, 2009; Thompson, 1996) y plantas superiores. Los ácidos grasos con 17, 22 y 24 carbonos de igual manera están presentes en los vegetales pero en cantidades pequeñas.

### 9.5.3 Comparación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos por medio de la Hidrólisis ácida en *N. oleoabundans* y *Scenedesmus sp.*

Al llevar a cabo la Sonicación de las muestras frescas directamente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (§ 8.8.2), se observó que no se disolvían, de tal forma que pareció que el solvente no penetró en las paredes de las microalgas, además no hubo una coloración (Figura 23, a). Es por ello que se empleó una hidrólisis ácida para romper las paredes celulares y comparar si hay un efecto sobre los ácidos grasos recuperados. Las microalgas al ser puestas en  $\text{HCl}$  0.1N se disolvieron completamente (Figura 23 b). Al concluir la Sonicación, en las muestras se formaron dos fases, donde los extractos mostraron una coloración verde pardo (Figura 23 c).



**Figura 23. Aspectos físicos de las microalgas: a) muestras no hidrolizadas, b) hidrólisis ácida, c) muestra hidrolizada después de la Sonicación.**

Al analizar las muestras de *N. oleoabundans*, los resultados mostraron que los especímenes que fueron hidrolizados recuperaron una mayor cantidad de compuestos que los que no se hidrolizaron (Tabla 8) y además se obtuvieron compuestos diferentes a los recuperados por los tratamientos térmicos (Tabla 4) como el ácido nonadecílico ( $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2$ ), el ácido pentadecílico ( $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$ ), el ácido eicosenoico ( $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ), pero no se obtuvo ácido oleico ( $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ) ni ácido palmítico ( $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ).

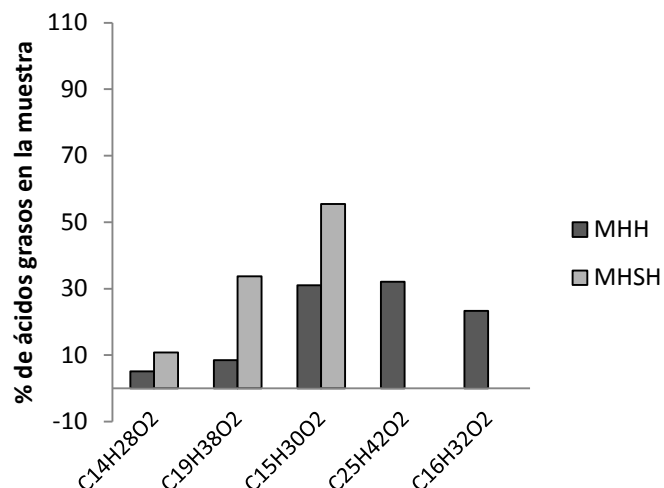
**Tabla 8. Ácidos grasos obtenidos en muestras frescas hidrolizadas y sin hidrolizar en *N. oleoabundans***

AG	PM	MHH	MHSH	GI	REF	NC
C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	228		10.77	1	Tornabene <i>et. al.</i> , (1983), Levine <i>et. al.</i> , (2010)	ácido mirístico
C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298	5.09		1	Tornabene <i>et. al.</i> , (1983), Levine <i>et. al.</i> , (2010)	ácido nonadecílico
C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	242	8.52		1	Tornabene <i>et. al.</i> , (1983), Levine <i>et. al.</i> , (2010)	ácido pentadecílico
C <sub>25</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	374	30.98		5		1 propil 7,10,13,16 docosatetraeonato
C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256		33.75	1	Tornabene <i>et. al.</i> , (1983), Levine <i>et. al.</i> , (2010)	ácido palmítico
C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	306	32.12		4	Tornabene <i>et. al.</i> , (1983)	ácido ecisatónico
C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	23.28	55.49	1	Tornabene <i>et. al.</i> , (1983), Levine <i>et. al.</i> , (2010)	ácido esteárico
Extracción Total		<b>99.1</b>	<b>100</b>			

AG: ácido graso; PM: Peso molecular; MHH: muestra húmeda hidrolizada; MHSH: muestra húmeda sin hidrolizar GI: Grado de insaturación; NC: nombre común.

Los porcentajes de los ácidos grasos extraídos en las muestras que fueron hidrolizadas mostraron que se recuperó del ácido ecisatónico un 32.12%, del 1 propil 7,10,13,16 docosatetraeonato un 30.98%, del ácido esteárico un 23.98%, una cantidad menor a la que se presentó en la muestra que no fue hidrolizada (55.49%), del ácido pentadecílico un 8.52% y finalmente del ácido nonadecílico un 5.09%. Mientras que en las muestras que no sufrieron de hidrólisis se recuperó ácido palmítico (C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>) con 33.75% y finalmente ácido mirístico (C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>) con 10.77% (Figura 24).





**Figura 24. Porcentajes de ácidos grasos en *N. oleoabundans* extraídos por hidrólisis y sin hidrólisis**

Con respecto a los ácidos grasos recuperados de las muestras hidrolizadas de *Scenedesmus sp.*, hubo presencia del ácido tridecílico (C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>), ácido pentadecílico (C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>), de metil, 6,9,12,15 hexadecatetraeonato (C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>), ácido palmítico (C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>) y ácido  $\alpha$ -linoleico (C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>; Tabla 9). Estos compuestos, a excepción del ácido palmítico y el metil, 6,9,12,15 hexadecatetraeonato, no estuvieron presentes en las muestras no hidrolizadas (Tabla 7).

**Tabla 9. Ácidos grasos obtenidos en muestras frescas hidrolizadas y sin hidrolizar en *Scenedesmus sp.***

AG	PM	MHH	MSSH	GI	REF	NC
C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	214	0.57		1	Shih- Hsin Ho, et. al., (2010)	ácido tridecílico
C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	242	2		1		ácido pentadecílico
C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	262	15.63	22.02	4	Shih- Hsin Ho, et. al., (2010)	metil, 6,9,12,15 hexadecatetraeonato

$C_{16}H_{32}O_2$	256	25.96	77.08	1	Shih- Hsin Ho, <i>et. al.</i> , (2010)	ácido palmítico
$C_{18}H_{30}O_2$	278	47.53		4	Shih- Hsin Ho, <i>et. al.</i> , (2010)	ácido $\alpha$ -linoleico
Extracción total		<b>99.69</b>	<b>99.1</b>			

AG: ácido graso; PM: Peso molecular; MHH: muestra húmeda hidrolizada; MHSH: muestra húmeda sin hidrolizar GI: Grado de insaturación; NC: nombre común.

Los porcentajes de extracción de los ácidos grasos de las muestras hidrolizadas se evidenció que en el caso del metil, 6,9,12,15 hexadecatetraeonato se obtuvo menos (15.63%) que la muestra que no fue hidrolizada (22.02%), lo mismo sucede con el ácido palmítico ya que con la muestra hidrolizada se recuperó un 25.96% a diferencia de un 77.08% en la muestra que no sufrió este tratamiento. Se recobró un 0.57% del ácido tridecílico, un 2 % del ácido pentadecílico y un 48.53% del ácido  $\alpha$ -linoleico (Fig. 25).

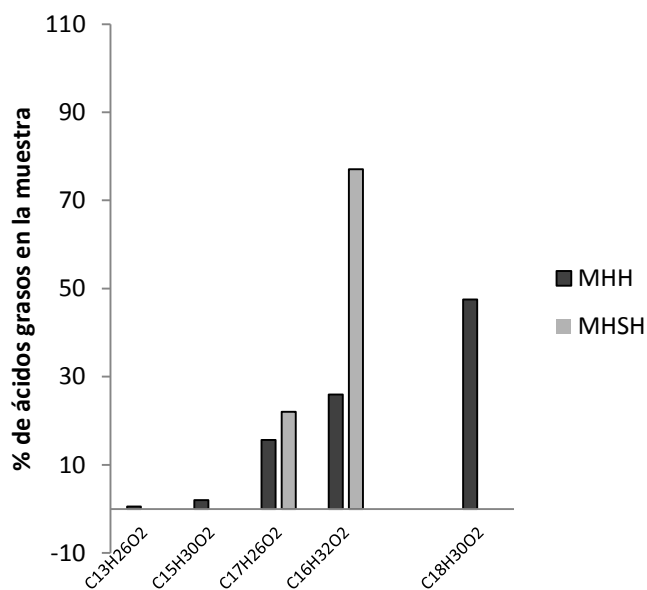


Figura 25. Porcentajes de ácidos grasos en *Scenedesmus sp.* extraídos por hidrólisis y sin hidrólisis

Fue evidente que hubo un efecto de la solución de HCl sobre las dos microalgas ya que se recuperaron más componentes con respecto a las muestras que no fueron hidrolizadas. Esto se debió a que el HCl provocó una ruptura de las paredes celulares de estos microorganismos, facilitó la ruptura de compuestos complejos y en consecuencia, hubo una extracción más sencilla de ácidos grasos. Sin embargo, también se observó que no se obtuvieron compuestos que no estuvieron presentes en las muestras que no fueron hidrolizadas, e incluso que tampoco se presentaron en los tratamientos térmicos; situación que puede explicarse por una posible destrucción de ácidos grasos.

Los ácidos grasos extraídos por medio de la hidrólisis fueron compuestos diferentes a los extraídos por medio de los métodos Soxhlet y Sonicación. Hubo compuestos con un mayor número de insaturaciones, por ejemplo el ácido  $\alpha$ -linoleico ( $C_{18}H_{30}O_2$ ), en *Scenedesmus sp.*, el 1 propil 7,10,13,16 docosatetraeonato ( $C_{25}H_{42}O_2$ ) y el ácido ecisatónico ( $C_{20}H_{34}O_2$ ) en el caso de *N. oleoabundans* y que son también reportados en la bibliografía (Tornabene 1983; Sanina, *et al.*, 2004; Gouviera, 2009) pero se encontraron todos en un rango de 12 a 22 Carbonos.

## 10. Conclusiones

1. Los tiempos de secado de las microalgas *N. oleoabundans* y *Scenedesmus sp.* dependieron directamente de la temperatura. A mayor temperatura, el tiempo de secado fue menor. Para *N. oleoabundans* se reportó para 100°C un tiempo de 48 min, en 80°C, 80 min; a 60°C, 120 min; 40°C, 300 min y a 20°C, 2280 min. En el caso de *Scenedesmus sp.* los tiempos de secado fueron los mismos que la otra microalga, excepto a las temperaturas de 60°C que duró 150 min y a 40°C un tiempo de 360 min.
2. El secado tuvo un efecto físico y químico en las dos microalgas, ya que provocó la formación de placas quebradizas y un encogimiento estructural reflejado en una destrucción y aglomeración celular, además las muestras presentaron cambios de color y un olor característico causado posiblemente por reacciones no enzimáticas de tipo de Maillard,
3. Las temperaturas de secado no tuvo un efecto sobre los ETO determinados de manera gravimétrica y extraídos por el método Soxhlet. Para la microalga *N. oleoabundans* se obtuvo entre un 24.91 y 28.45% de extracto, con un rendimiento de 99.02%; mientras que para *Scenedesmus sp.* se extrajo entre 21.87 y 25.84% con un rendimiento del 53.44%.
4. A través del análisis cromatográfico se observó que los tipos de ácidos grasos y la cantidad de los mismos recuperados de las dos microalgas tuvieron variaciones no sólo por efecto de la temperatura sino por el método de extracción. Para el caso de *N. oleoabundans* con el método Soxhlet se extrajo ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, mostrando una mayor presencia en las muestras húmedas. En el caso de la extracción por Sonicación, de *N. oleoabundans* se extrajeron compuestos con estructuras de 14 a 24 carbonos con una mayor presencia a temperatura de 40°C, que en la muestra húmeda y a 100°C. Para el caso de *Scenedesmus sp.* bajo la extracción Soxhlet se obtuvieron compuestos de 16 a 22 carbonos, mostrando una menor presencia en 100°C. Por la extracción por Sonicación, *Scenedesmus sp.* se recuperaron en las

muestras húmeda únicamente dos compuestos, el metil 6,9,12,15 hexadecatetraonato ( $C_{17}H_{26}O_2$ ) y el ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ).

5. El método de extracción Soxhlet y Sonicación tienen efectos diferentes sobre los ácidos grasos contenidos en las dos microalgas. Esto debido a las vibraciones que la Sonicación provoca a los compuestos, ocasionando una posible ruptura o destrucción de los ácidos grasos.
6. Al llevar a cabo una hidrólisis ácida en muestras húmedas de las microalgas se observó una mayor recuperación de ácidos grasos que en las muestras húmedas que no sufrieron hidrólisis y las muestras deshidratadas. En *N. oleoabundans*, se recuperaron compuestos con 14, 15, 18, 19, 20 y 25 carbonos y en *Scenedesmus* sp. hubo compuestos con 13, 15, 17, 16 y 18 carbonos.

## 11. Bibliografía

Agudelo S, John R.; Benjumea, Pedro; Gómez Meneses, Edwin; Pérez Bayer, Juan Fernando. (2003). *Biodiesel, una revisión del desempeño mecánico y ambiental*. Ingeniería & Desarrollo. Universidad del Norte, No. 13; pp. 1-14.

Aguilera-Morales, M.; Casas- Váldez, M.; Carrillo-Domínguez, S.; González-Acosta, B., Pérez-Gil, F. (2005). *Chemical composition and microbiological assays of marine algae Enteromorpha spp. as a potential food source*. Journal of Food Composition and Analysis, 18. pp. 79-88.

Ajanovic, Amela. (2010). *Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices?* Energy. 30. pp. 1-7.

Amaro Helena M.; Guedes A. Catalina; Malcata, F. Xavier. 2010. *Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel*. Applied Energy. Doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.014.

Arredondo-Vega, B.O.; Vázquez-Duhalt, R. (1991). *Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas*. Ciencias y desarrollo, 98. pp. 99-111.

Atadashi, I.M.; Aroua, M.K.; Abdul Aziz, A.R.; Sulaiman, N.M.N. (2012). *Production of biodiesel using high free fatty acids feedstocks*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16. pp. 3275-3285.

Azad Shah, A.K.M.; Tokunaga, Chikara; Kurihana, Hideyuli; Takahashi, Koretaro. (2009). *Changes in lipids and their contribution to the taste of migaki-nishin (dried herring fillet) during drying*. Food Chemistry, 115. pp. 1011-1018.

- Barbosa-Cánovas, Gustavo V.; Vega-Mercado, Humberto. (2000). *Deshidratación de Alimentos*. Editorial ACRIBIA. S.A. España. pp. 27-84.
- Chisti, Yusuf (2008). *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*. Trends in Biotechnology. Vol. 26, No. 3. pp. 126-131
- Chisti, Yusuf. (2007). *Biodiesel from algae*. Biotechnology Advances, 25. pp. 294-306.
- Demirbas, Ayhan; Demirbas, M. Fatih. (2010). *Algae Energy. Algae as a new source of Biodiesel*. Springer London Dordrecht Heidelberg New York. pp. 2.
- Dissa, A.O.; Demorieux, H.; Savadogo, P.W.; Segda, B.G.; Koulidiati, J. (2010). *Shrinkage, porosity and density behaviour during convective drying of spirulina*. Journal of Food Engineering. 97. pp. 410-418.
- Fannema, Owen R. (1996). *Food Chemistry*. Third Edition. Marcel Dekker, USA.
- Garibay Hernández, Adriana; Vázquez-Duhalt, Rafael; Sánchez Saavedra, M. del Pilar; Serrano Carreón, Leobardo; Martínez Jiménez, Alfredo. (2009) *Biodiesel a partir de Microalgas*. BioTecnología y Bioingeniería. Vol. 13. No. 3. pp. 31-68.
- Garibay Hernández, Adriana. (2008). *Evaluación de condiciones de cultivo en la producción de lípidos con el alga Neochloris Oleoabundans para su uso potencial como biodiesel*. Universidad Autónoma de México. Departamento de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.
- Geankopolis, Christie J. (1998). *Procesos de transporte y Operaciones Unitarias*. 3° Edición. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México.

- Gouveia, Luisa; Oliveira, Ana Cristina. (2009). *Microalgae as a raw material for biofuels production*. Journal Ind. Microbiol Biotechnology, 36. pp. 269-274.
- Hsieh, Chih-Hung; Wu, Wen-Teng. (2009). *Cultivation of microalgae for oil production with cultivation strategy of urea limitation*. Bioresource Technology, No.100, pp. 3921-3926.
- Jayathilakan, K.; Sharma, G.; Radhakrishna, K.; Bawa, A.S. (2007). *Effect of natural antioxidants on the lipid stability on fluidized bed-dried mutton*. Food Chemistry 100. pp. 662-668.
- Kates, M.; Work, E. (1986). *Lipids Extraction Procedures. Technics of Lipidology, Isolation, analysis and Identification of Lipids*. North Holland Publishing Company.
- Kneule, Friedrich. (1982). *El Secado*. Enciclopedia de la Tecnología Química: Técnica de procesos en las industrias químicas y derivadas. Volumen 1 de Enciclopedia de la Tecnología Química. 1º Edición en español, Editorial Urmo, Bilbao, España.
- Kou, Dawen; Mitra, Somenath. (2003). "Extraction of semivolatile organic compounds from solid matrices". En Mitra Somenath (compilador) *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Ed. John Wiley & Sons. USA.
- Laguna José. 1967. *Bioquímica*. La prensa Médica Mexicana. Segunda Edición
- Lardon Laurent; Helias Arnaud; Sialve Bruno; Steyer Jean-Philippe; Bernard Oliver. 2009. *Life-Cycle assessment of biodiesel production from microalgae*. Environmental Science & Technology. Vol. 43. No 17. pp. 6475- 6481.



Lee, Robert Edward. (2008). *Phycology*. Cambridge University Press. Fourth Edition.

Levine, Robert B.; Constanza-Robinson, Molly S.; Spatafora, Grace A. (2011). *Neochloris oleoabundans grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production*. Biomass and Bioenergy, No. 35. pp. 40-49.

Lin, Qiang; Lin, Junda. (2011). *Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of Scenedesmus rubescens like microalga*. Biosource Technology, 102. pp. 1615-1621.

Lopes, Eduardo Jacob; Queiroz Zepka, Leila; A. Pinto, Luiz Antônio; Queiroz, Maria Isabel. (2007). *Characteristics of thin –layer drying of the cyanobacterium Aphanothece microscopic Nägeli*. Chemical Engineering and Processing. Process Intensification. Vol. 46. Issue 1. pp. 63-69.

McMurry, John (2008). *Química Orgánica*. 7° Edición. Cengage Learning Editores.

Miranda, Margarita; Maureira, Héctor; Rodríguez, Katia; Vega-Gálvez, Antonio (2009). *Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of Aloe Vera (Aloe Barbadensis Miller) gel*. Journal of Food Engineering 91. pp. 297-304.

Moser, Bryan R. (2009). *Biodiesel Production, properties, and feedstocks*. In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant. 45; pp. 229-266.

Moser, Bryan R.; Vaughn, Steven F. (2012). *Efficacy of fatty acid profile as a tool for screening feedstocks for biodiesel production*. Biomass and Bioenergy, 37; pp. 31-41.

- Pruvost, J.; Van Vooren, G.; Legrand, J. (2009). *Investigation of biomass and lipids production with Neochloris oleoabundans in photobioreactor*. Bioresource Technology, 100. pp. 5988-5995.
- Ramezani, K.; Rowshanzamir, S., Eikani, M.H. (2010). *Castor oil transesterification reaction: A kinetic study and optimization of parameters*. Energy, No.30. pp. 1-7.
- Ramírez- Verduzco, Luis Felipe; Rodríguez- Rodríguez, Javier Estevan; Jaramillo-Jacob; Alicia del Rayo. (2012). *Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition*. Fuel, No. 91; pp.102-111.
- Rippka, Rosmarie; Deruelles, Jossete; Waterbury, John B; Hernand, Michael; Stainer Roger Y. (1979). *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria*. Journal of General Microbiology, 111, pp 1-61.
- Rodríguez, Jorge del Ángel; Carreón Palau; Arjona López, María (2007). "Extracción y Cuantificación de Lípidos". En Arredondo Vega Bertha Olivia, Voltonina Lobina, Domenico (compiladores) del texto *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Centro de Investigaciones del Noreste.
- Rosenberg, Julian N.; Oyler, George A; Wilkinson, Loy; Betenbaugh, Michael J. (2008). *A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution*. Current Opinion in Biotechnology 19. pp. 430-436.
- Sarukán, José. (2007). *Una visión Ecológica sobre la ética ambiental*. Diálogos de Biotética.[En línea]. México, disponible en [www.dialogos.unam.mx](http://www.dialogos.unam.mx) [Accesando el 15 de marzo de 2010]

- Sanina, Nina M.; Goncharova, Svetlana N.; Kostetsky, Eduard Y. (2004). *Fatty acid composition of individual polar lipid classes from marine macrophytes*. *Phytochemistry* 65. pp. 721-730.
- Scott Stuart A., Davey Matthew P., Dennis John S., Horst Imtraud, Howe Christopher J., Lea-Smith David J., Smith Alison G. 2010. *Biodiesel from algae: challenges and prospects*. *Current opinion in Biotechnology*, 21, pp. 1-10.
- Shih-Hsin Ho; Wen-Ming Chen; Jo-Shu Chang. (2010). *Scenedesmus obliquus CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production*. *Bioresource Technology*, No. 102. pp. 8725-8730
- Singh, Anoop; Singh Nigam, Poonam; Murphy, Jerry D. (2011). *Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels*. *Bioresource Technology*, No. 102. pp. 10-16.
- Spolaore, Pauline; Joannis-Cassan, Claire; Duran, Elie; Isambert, Arsène. (2006). *Commercial applications of Microalgae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol 101, No. 2. pp. 87-96.
- Stewart, O.J.; Raghavan, G.S.V.; Orsat, V.; Golden, K.D. (2003). *Effect of drying on unsaturated fatty acids and trypsin inhibitor activity in soybean*. *Process Biochemistry*, 39. pp. 483-489.
- Tan Tianwei; Lu Jike; Nie Kaili; Deng Li; Wang Fang. 2010. *Biodiesel production with immobilized lipase: A review*. *Biotechnology Advances* 28, pp. 628- 634.
- Tello-Ireland, Cristian; Lemus.Mondaca, Roberto, Vega-Gálvez, Antonio; López, Jessica; Di Scala, Karina. (2011). *Influence of hot-air temperatura on drying kinetics, functional*

*properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga Gracilaria chilensis.* LWT –Food Science and Technology. No. 30. pp. 1-7

Tornabene, T.G.; Holzer, G.; Lien, S.; Burris, N. (1983) *Lipid composition of the nitrogen starved green alga Neochloris oleoabundans.* Enzyme and Microbiological Technology. Vol, 5, Issue 6, pp. 435-440.

Thompson Jr., Guy A. (1996). *Lipids and membrane function in green algae.* Biochimica et Biophysica Acta. 1302. pp. 17-45.

Van Den Hoek, C.; Mann, D. G.; Jahns, H. M. (1995). *Algae. An Introduction to Phycology.* Cambridge University Press.

Vega Gálvez, A.; Tello Ireland, C.; Lemus Mondaca, R. (2007). *Simulación Matemática del proceso de secado de la Gracilaria Chilena (Gracilaria chilensis).* Ingeniare. Revista chilena de ingeniería. Vol 15, No. 1, 2007. pp 55-64.

Wade Jr.; L.G. (2004). *Química Orgánica.* 5° Edición. Pearson Prentice Hall. Madrid.

Xin Li; Hong-ying Hu; Yu-ping Zhang. (2011). *Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga Scenedesmus sp. under different cultivation temperature.* Bioresource Technology. 102, pp. 3098-3102.

Zepka, L.Q.; Lopes, Jacob, E.; Queiroz, M. I. (2007). *Efecto del procesamiento térmico sobre el perfil de ácidos grasos de la microalga Aphanothece microscópica Nägeli.* Ciencia y Tecnología alimentaria, año/vol. 5, número 005. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Reynosa, México. p. 368-371