



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

Efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y en ácidos grasos
precursores de biodiesel durante la separación de microalgas mediante
ozoflotación

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
I.Q. María Teresa Valeriano González

TUTOR PRINCIPAL:
Dra. María Teresa Orta Ledesma, II
COMITÉ TUTOR:
Dra. Rosa María Ramírez Zamora, II
Dra. Alejandra Martín Domínguez, IMTA
Dr. Pandiyan Thangarasu, FQ
M. en C. Isaura Yañez Noguez, II

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE 2013

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Ramírez Zamora Rosa María

Secretario: Dra. Martín Domínguez Alejandra

Vocal: Dra. Orta Ledesma María Teresa

1 er. Suplente: Dr. Thangarasu Pandiyan

2 d o. Suplente: M. en C. Yañez Noguez Isaura

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: Instituto de Ingeniería de la UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dra. Orta Ledesma María Teresa

FIRMA

(Segunda hoja)

Agradecimientos

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida para realizar mis estudios de maestría.

Al Fondo de Colaboración Internacional del Instituto de Ingeniería de la UNAM, mediante el proyecto "Separación de microalgas por ozoflotación para la producción de biodiesel"

A la Dra. María Teresa Orta Ledesma por todo el apoyo brindado durante la elaboración de este proyecto de tesis.

A la Dra. Alejandra Martín Domínguez y al Dr. Pandiyan Sarasvathi Thangarasu por formar parte de mi comité tutor y por sus valiosos comentarios hasta el final de mi trabajo.

A la Dra. Rosa María Ramírez Zamora y a la M. en C. Isaura Yañez Noguez por su incorporación a mi comité tutor y sus comentarios que me permitieron mejorar mi trabajo.

Al Dr. Ignacio Monje Ramírez por ser un tutor más de este trabajo de investigación, pero sobre todo por ser un gran amigo.

Dedicatoria

A mis padres Esther González y Guillermo Valeriano, por siempre creer en mí. Este logro también es de ustedes, nunca encontrare la forma de agradecerles todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos Miguel Ángel y Guillermo Javier, por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida.

Al amor de mi vida José Guillermo, por siempre alentarme a ser mejor cada día y creer en mí de una manera sobrenatural. Te amo.

A mis amigos Priscila, Andrea, Gabriel, Alberto, Isaac, Arnoldo, Edgar, Rodolfo y Mario, por hacer siempre tan amena la comida y las largas jornadas de trabajo.

A mis compañeros de proyecto Reyna, Khomo, Gaby, Vero y Pablo, por su aporte indirecto a este trabajo de investigación.

“Gracias...”

Contenido

Índice de figuras	2
Índice de Tablas	3
Resumen	4
Introducción	5
Objetivos	7
Marco teórico.....	8
Biocombustibles	8
Biodiesel	9
Biodiesel proveniente de microalgas.....	11
Metodología Experimental	24
Muestreo de agua con presencia de microalgas	24
Identificación y cuantificación de microalgas	25
Pruebas experimentales de ozoflotación en muestras de agua con microalgas.....	26
Determinación de la concentración de proteína total liberada de microalgas	29
Extracción y transesterificación de ácidos grasos presentes en microalgas	30
Resultados y Análisis	35
Identificación y cuantificación de las microalgas presentes en el lago Nabor Carrillo.....	35
Efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y su relación con la recuperación de biomasa	40
Efecto del ozono en la recuperación de biomasa seca.....	45
Efecto del ozono en la composición de ácidos grasos presentes en microalgas	48
Conclusiones.....	56
Trabajos futuros a desarrollar	57
Referencias	58
Anexo 1-Análisis estadístico	64

Índice de figuras

Figura 1 Mecanismo de extracción de lípidos por solventes orgánicos	19
Figura 2 Reacción de transesterificación para obtener Biodiesel.....	22
Figura 3 Diagrama general de la Metodología.....	24
Figura 4 Ubicación geográfica del lago Nabor Carrillo	25
Figura 5 Componentes de la unidad de oxidación con ozono.....	27
Figura 6 Concentrado de microalgas.....	30
Figura 7 Cromatograma de los metil ésteres de ácidos grasos, para identificar bacterias: Bacterial Acid Methyl Esters CP TM Mix. SUPELCO 4-7080	34
Figura 8 Sitio de muestreo en el lago Nabor Carrillo	36
Figura 9 Géneros predominantes de microalgas: Oscillatoria sp; Asthrospira sp. y Spirullina sp.....	37
Figura 10 Géneros de microalgas encontradas en las muestras del agua del lago Nabor Carrillo	38
Figura 11 Comparación del proceso de flotación con aire (a) y con ozono (b) respectivamente durante la recuperación de biomasa de microalga	40
Figura 12 Comparación del contenido proteínico liberado de las microalgas utilizando ozono y aire, como método de separación.....	41
Figura 13 Superficies de respuesta obtenidas para la liberación de proteínas totales por efecto del ozono	42
Figura 14 Relación entre la proteína total liberada y la biomasa seca, en función de la DAO44	
Figura 15 Relación entre la biomasa recuperada y la dosis aplicada de ozono	45
Figura 16 Superficies de respuesta obtenidas para la recuperación de biomasa (peso seco) en función del ozono	46
Figura 17 Efecto del ozono en la recuperación de biomasa algal (peso seco)	47
Figura 18 Superficies de respuesta obtenidas para los ácidos grasos extraídos (peso seco) en función del ozono.	50
Figura 19 Cromatograma obtenido para el consorcio de microalgas del lago Nabor Carrillo .	53
Figura 20 Abundancia relativa del perfil de ácidos grasos	54
Figura 21 Análisis estadístico para la liberación de proteína total.....	65
Figura 22 Análisis estadístico para la recuperación de Biomasa seca.....	66
Figura 23 Análisis estadístico para la recuperación de ácidos grasos presentes en microalgas	67

Índice de Tablas

Tabla 1 Perfil de ácidos grasos presentes en el biodiesel (Hoekman, 2011).....	10
Tabla 2 Comparación de técnicas de extracción de ácidos grasos.....	21
Tabla 3 Comparación de técnicas de transesterificación en lípidos de microalgas	23
Tabla 4 Valores codificados y propuestos para el diseño rotacional central compuesto	28
Tabla 5 Representación matricial de las pruebas a realizar	28
Tabla 6 Conteo promedio de microalgas en el lago Nabor Carrillo y en las Lagunas facultativas	35
Tabla 7 Contenido lipídico y proteínico de las microalgas encontradas en el lago Nabor Carrillo	39
Tabla 8 Máxima liberación de proteína total	44
Tabla 9 Efecto de la DAO en la recuperación de la biomasa	48
Tabla 10 Incremento en la cantidad de ácidos grasos extraídos por efecto del ozono	49
Tabla 11 Análisis de ácidos grasos extraídos por efecto del ozono.....	51
Tabla 12 Análisis de varianza de la liberación de proteína total por efecto del aire y el ozono	64
Tabla 13 Análisis de varianza para la recuperación de la biomasa.....	64
Tabla 14 Condiciones del modelo de superficie obtenidas para la máxima liberación de proteína total	65
Tabla 15 Condiciones del modelo de superficie obtenidas para la máxima recuperación de biomasa seca	66
Tabla 16 Condiciones del modelo de superficie obtenidas para la máxima recuperación de ácidos grasos	67

Resumen

El objetivo general de este trabajo es evaluar el efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y en los ácidos grasos de microalgas de zona del ex lago de Texcoco, con potencial aprovechamiento para la producción de biodiesel.

Para lograr el objetivo de éste trabajo se obtuvieron muestras de agua del lago artificial Nabor Carrillo, el cual se encuentra ubicado en la zona del ex lago de Texcoco. Del consorcio natural de microalgas se lograron identificar 19 géneros; destacándose los géneros de *Chlorella sp* (10-57% lípidos) y *Cyclotella sp* (42% lípidos) para la producción de biodiesel, debido a su alto contenido de lípidos. De igual forma, se observó que el género *Desmodesmus sp* (20% lípidos) presenta una gran facilidad para reproducirse en agua residual.

Las muestras de agua con presencia de microalgas fueron sometidas al efecto del ozono. Se observó un incremento de la concentración de proteínas totales en el medio acuoso, el cual se relaciona con la liberación de estas moléculas por efecto del daño causado por el oxidante en las microalgas. La proteína total liberada actúa como un surfactante natural, favoreciendo la formación de espuma mediante la cual se produce la separación de la biomasa presente en el agua. Se encontró que existe una relación directa entre la recuperación de la biomasa y la dosis aplicada de ozono (DAO).

La biomasa algal que fue cosechada mediante ozoflotación, se sometió a un proceso de extracción de ácidos grasos mediante solventes orgánicos. Al comparar la cantidad de ácidos grasos extraídos de muestras que fueron cosechadas sin ozono (centrifugadas) con muestras separadas con ozoflotación, se observó una mayor cantidad de lípidos extraídos (hasta un 100%) de muestras que estuvieron en contacto con el oxidante, respecto a la biomasa obtenida por centrifugación. Se concluyó que la lisis celular causada por el ozono funciona como un pre-tratamiento para etapas posteriores.

Sí bien el proceso de ozoflotación funciona como un proceso de separación y de pre-tratamiento, podría generar la oxidación de los ácidos grasos precursores de biodiesel. Bajo las condiciones de la muestra utilizada en este trabajo de investigación se encontró que DAO superiores a 38 mgO₃/L de agua producen la oxidación de los lípidos.

El perfil de ácidos grasos obtenidos para cada época del año, presento una abundancia relativa diferente, la cual se modificó por efecto del oxidante.

Introducción

A nivel mundial se presenta un constante aumento en la demanda de energía, siendo los combustibles fósiles la fuente más económica (FAO, 2008). Se estima que con el ritmo actual de consumo, las reservas de petróleo (1,354 billones de barriles) serán agotadas en 50 años (IEA, 2010; Huang et al., 2010).

Por otra parte, los combustibles fósiles tienen un impacto negativo en el ambiente por la generación de gases de efecto invernadero, la acidificación del ambiente (aire y suelos), la formación de partículas en el aire, la eutrofización de cuerpos de agua, toxicidad en seres vivos, entre otros inconvenientes (Singh et. al, 2012).

El biodiesel es un combustible alternativo y una fuente de energía renovable, biodegradable, cuyo uso contribuiría a reducir las emisiones de azufre y monóxido de carbono en un 30% y 10% respectivamente, además de que no contiene compuestos aromáticos y posee mejores propiedades de combustión (Huang et al., 2010). Se puede obtener a partir de materias primas tales como: derivados agrícolas (caña de azúcar), plantas alimenticias (granos de maíz, aceites de semillas), insumos no alimenticios (residuos agrícolas y forestales) y microalgas (Álvarez, 2009).

Existe controversia respecto de la producción de biodiesel a partir de materias primas alimenticias, es por ello, que la utilización de biomasa de microalgas cada día toma más fuerza. Entre las ventajas que estas últimas tienen, es que no requieren de grandes espacios para su reproducción y tienen tasas de crecimiento más altas que las plantas terrestres, por ejemplo las algas verdes pueden duplicar su biomasa en menos de 24 hr (Brennan, 2010). Las microalgas pueden cultivarse en diferentes tipos de agua (entre estas, en agua residual), poseen un alto contenido de ácidos grasos por gramo de biomasa y dado que son organismos fotosintéticos, utilizan la radiación solar y el CO₂ atmosférico como fuente de carbono para producir biomasa.

En el mundo existen pocas empresas productoras de biodiesel a partir de microalgas, éstas se encuentran principalmente en los Estados Unidos de América, EUA (Chisti & Yon, 2011). Los biocombustibles de tercera generación como el biodiesel de microalgas, es una

tecnología que se encuentra en fase de desarrollo, siendo la producción de biomasa a gran escala y la cosecha de la misma, las principales limitantes del proceso de producción.

Este trabajo de investigación aborda una tecnología novedosa para el cosechado de las microalgas mediante flotación con ozono, en la cual se evalúa el efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y en la composición de los ácidos grasos de microalgas, con potencial aprovechamiento para la producción de biodiesel.

La cosecha de microalgas constituye del 20-30% del costo total de producción del biodiesel y se realiza mediante diferentes procesos (sedimentación, centrifugación, filtración, ultrafiltración, la floculación-flotación y la flotación con aire asistida con coagulantes), siendo el más utilizado la centrifugación.

No obstante, la aplicación de nuevas tecnologías empieza a cobrar importancia, es el caso de la cosecha de microalgas mediante la flotación con ozono (ozoflotación), un proceso ligado a la liberación de metabolitos intracelulares de las microalgas, los cuales actúan como surfactante, favoreciendo la formación de espuma y la separación de la biomasa algal. Cheng et al., (2010) reportaron la cosecha de microalgas con ozono sin la utilización de un coagulante adicional, destacando el efecto en la liberación de proteínas presentes en las microalgas, las cuales actúan como surfactantes naturales.

Como parte de este trabajo de investigación se evalúa la relación que existe entre la proteína total liberada durante el proceso de ozoflotación y la biomasa recuperada, así como la posible oxidación de los ácidos grasos precursores del biodiesel presentes en la biomasa algal.

Objetivos

Objetivo General:

Evaluar el efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y en la composición de los ácidos grasos de microalgas de la zona del Ex lago de Texcoco, con potencial aprovechamiento para la producción de biodiesel.

Objetivos particulares:

- ✓ Identificar y cuantificar las familias de microalgas presentes en el Lago Nabor Carrillo en épocas cálida y fría, con potencial de aprovechamiento para la producción de biodiesel.
- ✓ Determinar el efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y su relación con la recuperación de microalgas productoras de ácidos grasos precursores de biodiesel en muestras de agua de la zona del Ex lago de Texcoco.
- ✓ Evaluar el efecto del ozono en la composición de los ácidos grasos precursores de biodiesel presentes en microalgas durante el proceso de ozoflotación, en referencia a la composición inicial en las microalgas.

Marco teórico

Biocombustibles

Los biocombustibles son alcoholes, éteres, ésteres y otras biomoléculas producidas a partir de biomasa de plantas, desechos industriales y productos de agricultura. Se obtienen en diferentes estados de agregación: sólidos (por ejemplo leñas, astillas o carbón vegetal), líquidos (bioetanol, bioalcoholes o biodiesel) y gas (biogás). Entre los más populares se encuentran el bioetanol y el biodiesel, siendo este último el biocombustible de interés para este trabajo de investigación.

Los biocombustibles se clasifican de acuerdo a la materia prima y a la tecnología empleada para producirlos, en biocombustibles de primera, segunda, tercera y cuarta generación (Maciel, 2009).

Los de primera generación son de procedencia agrícola y plantas alimenticias, tienen como característica un alto contenido de almidón, azúcares y aceites; como es el jugo de la caña de azúcar, de remolacha o de betabel, granos de maíz, aceites de semillas de girasol, de palma, de ricino, de coco o de cacahuete, entre otros. De igual forma se emplean grasas de animales, aceites de desecho (provenientes de la elaboración de alimentos) y desperdicios orgánicos. Dichos biocombustibles son producidos a partir de tecnologías convencionales como la fermentación, transesterificación y digestión anaerobia, obteniéndose mediante fermentación etanol, metanol y n-butanol, a partir de la transesterificación biodiesel y biogás con digestión anaerobia.

Los de segunda generación emplean como materia prima residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa, ejemplo de éstos son el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, ramas secas de árboles, etcétera. Entre los procesos de producción destacan la sacarificación-fermentación y el proceso de Fischer-Tropsch, de los cuales se obtiene etanol, metanol, gas de síntesis, biodiesel, entre otros.

Los insumos vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética de sus componentes químicos, son utilizados en los biocombustibles de tercera generación; entre ellos podemos encontrar los pastos perennes, árboles y plantas de

crecimiento rápido, algas verdes y cianobacterias. Las tecnologías de obtención de este tipo de biocombustibles se encuentran en fase de desarrollo.

Por último, los biocombustibles de cuarta generación, los cuales consideran tecnologías de optimización de materias primas genéticamente diseñadas para capturar grandes cantidades de carbono, generar combustibles más eficientes y combinarlos con la tecnología de captura y almacenamiento de CO₂ (CAC).

Biodiesel

El biodiesel es un biocombustible, que se obtiene mediante transesterificación de aceites vegetales o grasas animales. Está compuesto por ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés) o ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) saturados e insaturados (Fazal et al., 2011; Knothe, 2009; Sharma et al., 2008).

Los ácidos grasos transesterificados con metanol dan como resultado un biodiesel compuesto por diversos FAME, la Tabla 1 muestra el perfil de ácidos grasos presentes en éste, se destacaron los comúnmente encontrados en el biodiesel de procedencia vegetal o animal (Hoekman et al., 2011; Knothe, 2008).

La composición del biodiesel aporta propiedades que lo hacen diferente al combustible fósil, por ejemplo el biodiesel presenta un menor poder calorífico, una mayor viscosidad, baja volatilidad, mayor densidad y contiene oxígeno, el cual permite una auto oxidación.

El biodiesel tiene como ventaja ser una energía renovable, biodegradable, libre de sulfuros y compuestos aromáticos, menor índice de emisiones de hidrocarburos policíclicos aromáticos, monóxido de carbono, dióxido de carbono, partículas y humo, sin embargo presenta un aumento en la emisión de óxido de nitrógeno (Fazal et al., 2011; Yusuf et al., 2011; Cho et al., 2011; Murugesan et al., 2009).

La principal desventaja del biodiesel se encuentra en el proceso de producción, debido a que es una tecnología en fase de desarrollo (Fazal et al., 2011; Sharma et al., 2008; Knothe, 2008).

Tabla 1 Perfil de ácidos grasos presentes en el biodiesel (Hoekman, 2011)

<i>Nombre común</i>	<i>Nomenclatura química</i>	<i>Formula química</i>		<i>Peso molecular</i>
Ácido Láurico	Ácido dodecanóico	$C_{12}H_{24}O_2$	C12:0	200.32
Ácido Mirístico	Ácido tetradecanoico	$C_{14}H_{28}O_2$	C14:0	228.38
Ácido Miristoleico	Ácido 9-tetradecenoico	$C_{14}H_{26}O_2$	C14:1	226.26
Ácido Palmítico	Ácido hexadecanoico	$C_{16}H_{32}O_2$	C16:0	256.43
Ácido Palmitoleico	(Z)-9 hexadecenoico ácido	$C_{16}H_{30}O_2$	C16:1	254.42
Ácido Esteárico	Ácido octadecanoico	$C_{18}H_{36}O_2$	C18:0	284.48
Ácido Oleico	cis-9-octadecenoico ácido	$C_{18}H_{34}O_2$	C18:1	282.47
Ácido Linoleico	cis-9, 12-octadecenoico ácido	$C_{18}H_{32}O_2$	C18:2	280.46
Ácido Linolénico	cis-9, 12, 15-octadecenoico ácido	$C_{18}H_{30}O_2$	C18:3	278.44
Ácido Araquídico	Ácido eicosanoico	$C_{20}H_{40}O_2$	C20:0	312.54
Ácido Gondoic	cis-11-eicosanoico ácido	$C_{20}H_{38}O_2$	C20:1	310.54
Ácido Behénico	Ácido docosanoico	$C_{22}H_{44}O_2$	C22:0	340.60
Ácido Erúcido	cis-13-docosenoico ácido	$C_{22}H_{42}O_2$	C22:1	338.58

Biodiesel proveniente de microalgas

Las microalgas como materia prima permiten la producción de diferentes biocombustibles, por ejemplo, metano a través de digestión anaerobia, hidrógeno mediante el proceso de fotosíntesis y biodiesel derivado del aceite (Chisti, 2007).

Estudios en donde se compara el uso de diferentes materias primas (cultivos alimenticios y no alimenticios) para producir biodiesel, indican que los biocombustibles de tercera generación, como los provenientes de microalgas cultivadas en agua residual, es hasta el momento de las únicas alternativas que se tienen para producir biodiesel de manera renovable, sin embargo existen pocos estudios bajo estas condiciones (Christenson & Sims, 2011; Ahmad et al., 2011).

Aunque el biodiesel producido a partir de los lípidos contenidos en microalgas es una fuente de energía renovable para sustituir al diésel, existe la dificultad en el proceso de producción de biodiesel, dichas dificultades se presentan en el cultivo de las microalgas y la cosecha de las mismas (Demirbas, 2011).

A continuación se describen las etapas del proceso de producción del biodiesel a partir de microalgas, iniciando por detallar a las microalgas y posteriormente las etapas del proceso: (1) cultivo de las microalgas, (2) cosecha de las microalgas, (3) pre-tratamiento, (4) extracción de lípidos, (5) transesterificación y (6) obtención del producto (biodiesel).

Microalgas

Las microalgas son formas de vida muy antiguas, las algas son células procariotas (cianobacterias) y eucariotas (algas verdes, algas rojas y diatomeas); dentro de su estructura las cianobacterias carecen de ciertos organelos como son plastos, mitocondrias, núcleo, aparato de Golgi y flagelos, son organismos parecidos a las bacterias; por otra parte las células eucariotas contienen los organelos antes mencionados.

De igual forma las microalgas pueden ser organismos autotróficos o heterotróficos; las primeras requieren sólo de compuestos inorgánicos tales como CO₂, sales y una fuente de luz para el crecimiento, mientras que las segundas son organismos no fotosintéticos por lo tanto requieren una fuente externa de compuestos orgánicos, así como nutrientes como

fuelle de energía. Para las algas autótrofas, la fotosíntesis es la clave de su supervivencia, por lo que convierten la radiación solar y CO₂ absorbido por los cloroplastos en trifosfato de adenosina (ATP) y del O₂ en energía utilizable a nivel celular, produciéndose la respiración, apoyando el crecimiento de los organismos (Brennan & Owende, 2010).

La utilización de microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles ofrece diversas ventajas entre las cuales se destacan (Yang et al., 2011; Demirbas, 2011; Brennan & Owende, 2010; Chisti, 2007):

- Organismos fotosintéticos capaces de duplicar su biomasa en 24h.
- Para su crecimiento las microalgas requieren de luz solar, dióxido de carbono (CO₂), agua y sales inorgánicas.
- No requieren de productos químicos tales como herbicidas o pesticidas para su crecimiento.
- Menor requerimiento de área para su reproducción.
- No son dependientes de un suelo fértil.
- No requieren un suministro de agua dulce.
- Las microalgas pueden cultivarse en agua residual bajo condiciones controladas, contribuyendo a la remoción de nitrógeno y fósforo.
- Las microalgas funcionan como un tratamiento terciario de aguas residuales.
- Alto contenido de lípidos (puede exceder el 80% en peso seco).
- CO₂ como fuente de carbono, 1Kg de biomasa fija 1.83Kg CO₂.
- La utilización de microalgas no compromete la producción de alimentos.
- Las microalgas producen subproductos de alto valor agregado como son proteínas, pigmentos, biopolímeros e hidratos de carbono.

Como se mencionó, las microalgas presentan un rendimiento de aceite mayor que cualquier otro cultivo convencional, se calcula que es aproximadamente de 10 a 20 veces mayor que el derivado del aceite de palma y de 200 a 400 veces mayor que el derivado del aceite de soya (Loera-Quezada & Olguin, 2010).

Los lípidos de las microalgas son reservas de energía que se encuentran dentro de la estructura celular, por ejemplo, los glicerolípidos se encuentran en la estructura de la

membrana, los triglicéridos funcionan principalmente como una forma de almacenamiento de carbono y energía, en condiciones de ésteres las microalgas producen mayor cantidad de lípidos (Rosch et al., 2012; Hu et al., 2008).

Además de los lípidos, las microalgas cuentan con otros constituyentes bioquímicos de gran importancia, como los carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. Cada uno de éstos grupos tiene una función dentro del metabolismo de las microalgas (Williams & Laurens, 2010).

Las microalgas contienen una amplia variedad de carbohidratos, los cuales tienen funciones estructurales y metabólicas, estas biomoléculas son producto de la fotosíntesis y tienen como finalidad ser precursores en la síntesis de otras biomoléculas.

De igual forma las proteínas realizan funciones metabólicas y estructurales, son utilizadas como catalizadores enzimáticos del metabolismo celular; dentro de sus funciones estructurales se destaca la formación del soporte para las moléculas de clorofila, las cuales realizan la captación de luz del cloroplasto. Entre los amino ácidos contenidos en las proteínas de las microalgas se tienen los esenciales como son: Arginina (Arg), Histidina (His), Isoleucina (iLeu), Leucina (Leu), Lisina (Lys), Metionina (Met), Fenilalanina (Phe), Treonina (Thr), Valina (Val) y Triptófano (Trp); por otra parte los no esenciales son: Alanina (Ala), Ácido aspártico (Asp), Cisteína (Cys), Ácido glutámico (Glu), Glicina (Gly), Prolina (Pro), Serina (Ser) y Tirosina (Tyr); es preciso mencionar que varios de estos amino ácidos son de carácter surfactante (Becker, 2007; Brown & Jeffrey, 1995).

Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) trabajan en conjunto con las proteínas proporcionando la división y el crecimiento de las microalgas; los ácidos nucleicos son aproximadamente del 3-5% de la biomasa celular donde se encuentra la mayor cantidad del fosfato de la célula.

Cultivo de microalgas

El cultivo de algas es la etapa en la cual se busca el incremento de la biomasa, las microalgas se desarrollan en ambientes que provean las condiciones ideales para dicha acción, estas requieren de una fuente de luz, carbono (CO₂), agua (natural, residual o salobre), macro nutrientes (C, N, P, S, Ca, Mg y K) y micro nutrientes (Mo, Fe, Ni, Cu, Zn, Co, B, Mn, Cl⁻), además de referir a una temperatura favorable de 20-30°C y un pH (Yang et

al., 2011; Markou & Georgakakis, 2011). El cultivo se desarrolla en sistemas abiertos o cerrados.

De manera general, los sistemas de cultivo cerrados se utilizan para producir de 2-8 g/L cantidades de biomasa (ZHU et al., 2013), inclusive cuando se desea desarrollar una sola especie; de manera general un biorreactor consiste de un arreglo matricial de tubos de plástico o de vidrio, de aproximadamente 0.1m de diámetro o menor, permitiendo una penetración efectiva de la luz solar; de igual forma se tienen condiciones de operación controladas como son la disponibilidad de la fuente de carbono, la iluminación, la temperatura y el flujo de nutrientes; sin embargo, el biorreactor presenta problemas de sedimentación con el flujo de las microalgas a través de éste, la producción de oxígeno (que a concentraciones elevadas inhabilita el crecimiento de las algas), el aumento del pH y problemas de escalamiento y de limpieza (FAO, 2009; Chisti, 2007).

Por otra parte, los sistemas de cultivo abierto para microalgas son más simples y generan una producción de biomasa de 0.1-0.5g/L (ZHU et al., 2013), dichos sistemas consisten en estanques al aire libre de baja profundidad (0.3-0.5m), sin agitación; sin embargo dicho sistema presenta ciertas desventajas como lo son la disponibilidad de CO₂, siendo la solubilidad de la fuente de carbono la limitante para el desarrollo de las microalgas; de igual forma la disponibilidad de nutrientes, la penetración de la luz solar, el control de la temperatura y la invasión de depredadores (FAO, 2009). Los sistemas de cultivo abierto son considerados como apropiados para la producción de algas a gran escala (Chisti, 2007).

Como ya se mencionó, una problemática que presenta la producción de biodiesel a partir microalgas es el cultivo de las mismas, es por ello que el cultivo de la biomasa utilizando agua residual reduce los insumos del proceso (Cho et al., 2013; Rawat et al., 2011), debido a que ofrece como ventaja una reducción en la adicción de nutrientes para el desarrollo de la biomasa; requiriéndose aguas con nutrientes como nitrógeno y fósforo (Markou & Georgakakis, 2011).

De igual forma, el cultivo de la biomasa funciona como un tratamiento biológico de aguas residuales, como las de uso doméstico, industrial, agroindustrial y tratamiento de residuos agrícolas (Raouf-Abdel et al., 2012). Las microalgas absorben compuestos inorgánicos (macro y micro nutrientes), reduciendo la carga inorgánica y orgánica y removiendo metales pesados (tales como Cu²⁺, Pb²⁺, Cr³⁺, Ni²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺) presentes en las aguas residuales (Markou & Georgakakis, 2011). De igual forma el cultivo de microalgas en agua

residual se convierte en un tratamiento ambientalmente responsable y sostenible, debido a que no generan contaminantes secundarios (lodos), sino que mediante la recuperación de la biomasa se presenta el reciclado de nutrientes, la cual se puede utilizar como fertilizantes o alimento para animales (Rawat et al., 2011; Pittman et al., 2010).

Un inconveniente en la utilización de aguas residuales como medio de cultivo en el desarrollo de microalgas es la variabilidad en la composición y en la cantidad de la misma, el cual se ve afectado por la variación estacional a lo largo del año (Markou & Georgakakis, 2011); de igual forma existen diversos factores en la composición del agua residual que inhibe el crecimiento de las microalgas, como son altas concentraciones de amoníaco, cadmio, mercurio, bacterias patógenas o depredadores (Pittman et al., 2010).

Cosecha de microalgas

La etapa cosecha o recolección consiste en la recuperación de la biomasa del medio acuoso en el que fue cultivada, los métodos de cosecha más comunes son la sedimentación, centrifugación, filtración, ultrafiltración, la floculación-flotación y la flotación. La cosecha de microalgas dentro del proceso de producción de biodiesel, implica del 20-30% del costo total de producción, debido a que es necesario procesar grandes volúmenes de agua para obtener la biomasa; se favorecen los procesos que involucran coagulantes químicos, sin embargo estos procesos no obtienen un producto biológicamente puro, además se sabe que el uso de floculantes modifica los constituyentes del aceite presente en las microalgas (Halim et al., 2012; Christenson & Sims, 2011; Borges et al., 2011).

Como se describió en líneas anteriores existen diversos métodos para el cultivo de las microalgas, para los fines de este trabajo de investigación sólo se describirá la cosecha de las microalgas mediante la ozoflotación.

Ozoflotación

La ozoflotación es la combinación de las propiedades oxidantes del ozono con el proceso de flotación para la remoción de partículas suspendidas en agua. A través de la ozoflotación se busca separar la biomasa algal del agua debido a que en el proceso se obtiene la disminución del potencial zeta de las partículas, incluidas las microalgas, favoreciendo la

formación de aglomerados de células al momento de la cosecha. Por otra parte, al utilizar ozono como gas de dispersión, éste produce lisis en la membrana de las microalgas, dando lugar a la liberación de biopolímeros que funcionan como coagulantes, y de igual forma la lisis de la membrana se puede utilizar como un pre-tratamiento para etapas posteriores (por ejemplo en la extracción de los ácidos grasos) (Cheng et al., 2010; Miao & Tao, 2009).

El ozono al ser un oxidante provoca la lisis de diferentes algas, teniendo como consecuencia la liberación de biopolímeros presentes en las microalgas, por ejemplo ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos. El ozono actúa en la liberación de coagulantes orgánicos naturales; y disminuye el efecto de los biopolímeros que algunas especies de algas excretan de forma natural que pueden afectar la coagulación (Langlais et al., 1991).

Estudios anteriores demostraron que el ozono produce cambios en las propiedades de las proteínas, como en el caso del espumado, en el cual se ve afectado el volumen y la estabilidad de la burbuja formada por la proteína (Uzun et al., 2012). La oxidación de aminoácidos puede inducir en un aumento de la flexibilidad o rigidez de la cadena proteínica, causando alteraciones en la estructura secundaria y terciaria de la proteína; por otra parte, la capacidad de formación de espuma depende de la adsorción rápida en la interface aire-agua (Cataldo, 2003).

Aunque todos los aminoácidos son objetivos para la oxidación, los más sensibles de ser oxidados son Tyr, Trp, y el azufre que contienen los aminoácidos Cys, Met, además de los ácidos alifáticos de Arg, Lys, Phe y His (Uzun et al., 2012).

Casos de estudio de para la cosecha de microalgas a través de ozoflotación

En el 2008 Jeng evaluó la acción del ozono y del permanganato como preoxidantes para remover algas de un cuerpo de agua, dicho estudio reporta la utilización de concentraciones de ozono que van desde 1-7mgO₃/L, obteniéndose el mayor porcentaje de remoción de algas (93%) a 3 mgO₃/L, concentraciones superiores de oxidante obtuvieron porcentajes de remoción inferiores (Jeng et al., 2008).

Cheng (2010) obtuvo resultados satisfactorios de flotación de *Scenedesmus obliquus* FSP-3 con una dosis de 0.2-0.5 mgO₃/mg Biomasa; de igual forma dicho autor realizó la flotación de *Chlorella vulgaris* con una dosis requerida de 0.005-0.03 mgO₃/mg Biomasa. Es preciso mencionar que dichos resultados fueron obtenidos para una sola especie de microalga y

cultivadas en medios nutritivos. El autor concluyó que la dosis de ozono está en función de la turbiedad de la muestra y de la especie de microalga a cosechar (Cheng et al., 2011; Cheng et al., 2010).

El parámetro de turbiedad se relaciona con el contenido de microalgas presentes en la muestra, influyendo de manera directa con el consumo de ozono. Y la especie de microalga se relaciona con el contenido proteínico, ya que actúa como biosurfactante natural.

Pre-tratamiento de la biomasa

El pre-tratamiento de la biomasa colectada tiene como objetivo el acondicionamiento de la misma hacia la siguiente etapa de producción (extracción de lípidos). Con el pre-tratamiento se busca la ruptura de la pared celular para así obtener una mayor liberación de metabolitos precursores para la producción de biodiesel, a mayor daño celular aumenta la eficiencia de extracción (Halim et al., 2012; Lee et al., 2010).

Existen diferentes métodos para efectuar el pre-tratamiento de la biomasa, cada uno de éstos realiza diferente daño a la célula de la microalga, algunos de los procesos utilizados para la ruptura celular son: sonicación, homogenización a alta presión, molienda con bolas, microondas, lisis químico, shock osmótico y soluciones de NaCl 10%. Diversos autores han estudiado la eficiencia de cada uno de los procesos mencionados, concluyendo que el grado de lisis causado por el proceso depende del microorganismo a tratar (Halim et al., 2012; Lee et al., 2010; Chisti & Moo-Young, 1986)

La recuperación de los ácidos grasos a partir de microalgas se puede mejorar de 3-4 veces a través de la utilización de pre-tratamiento, sin embargo la mayoría de los pre-tratamientos requieren de un alto consumo energético (Lee et al., 2012).

Extracción y transesterificación de ácidos grasos

El tamaño de las microalgas es un problema durante la cosecha de la biomasa, sin embargo, durante la extracción de lípidos puede ser una ventaja, debido a que proporcionan una alta superficie de contacto con los disolventes, formando una fase homogénea.

Se puede definir a los lípidos como cualquier molécula biológica que es soluble en un disolvente orgánico, se clasifican en dos categorías en función de la polaridad del grupo funcional principal de las moléculas: (1) lípidos neutros comprenden acilgliceroles y ácidos grasos libres, (2) lípidos polares que son subcategorizados en fosfolípidos y glicolípidos. Dentro de las microalgas los lípidos neutros se utilizan principalmente en el almacenamiento de energía y los lípidos polares se utilizan en la formación de la membrana celular. Sin embargo, existen algunas especies de lípidos neutros que no contienen ácidos grasos tales como hidrocarburos, esteroides, cetonas y pigmentos (carotenos y las clorofilas) que no son convertibles en biodiesel (Halim et al., 2012).

Los ácidos grasos son constituyentes de los lípidos (neutros y polares), están constituidos por un grupo carboxilo (grupo hidrófilo) y una cadena de hidrocarburos (grupo hidrófobo); existen los ácidos grasos saturados los cuales no presentan ningún enlace doble, mientras que los ácidos grasos insaturados contienen al menos un enlace doble dentro de la cadena hidrocarbonada (Halim et al., 2012).

La extracción de ácidos grasos se efectúa de diferentes formas a nivel laboratorio, entre éstos destacan los métodos de extracción con solventes orgánicos, la extracción mediante ultrasonido, extracción mediante fluidos supercríticos, extracción asistida por microondas, shock osmótico, la extracción enzimática y la destrucción mecánica (Lee et al., 2010).

El proceso de extracción de ácidos grasos debe ser selectiva a estos compuestos, debido a que se busca reducir la extracción de otras moléculas presentes en las microalgas (por ejemplo: proteínas y carbohidratos), de no ser el caso se recurre a una etapa posterior de purificación; cabe destacar que el método seleccionado en este trabajo de investigación, es la extracción mediante una mezcla de solventes orgánicos (polar, no-polar).

El solvente orgánico no-polar (cloroformo o hexano) interactúa con lípidos neutros utilizando fuerzas de van der Waals; sin embargo, en el citoplasma se encuentran moléculas complejas formadas por lípidos neutros y lípidos polares, los cuales están vinculados a las proteínas de la membrana celular mediante enlaces de hidrógeno, por lo tanto la fuerzas de van der Waals ejercidas por el solvente no-polar no son suficientes para impedir estas interacciones. Por otra parte, el disolvente polar (metanol o etanol) es capaz de romper la interacción complejo lípido-proteína mediante la formación de enlaces de hidrógeno con los lípidos que se encuentran en el complejo (Halim et al., 2012; Medina et al., 1998).

Durante la extracción de lípidos, la biomasa seca es expuesta a solventes orgánicos que extrae los lípidos de la célula; la extracción de lípidos a partir de solventes orgánicos, polares o no polares, sigue el principio de "similar disuelve similar"; la extracción de ácidos grasos se realiza con solventes orgánicos polares o no polares, inclusive con una mezcla de estos solventes, el mecanismo general de extracción se puede resumir en los siguientes pasos (Figura 1) (Halim et al., 2012): (1) los solventes penetran a través de la membrana celular hasta el citoplasma, (2) el solvente interacciona con el complejo lípido, (3) el complejo lípido-solvente se disocia de la membrana celular, (4) el complejo lípido-solvente se difunden a través de la membrana celular y (5) el complejo sale de la célula, transportándose al seno del solvente.

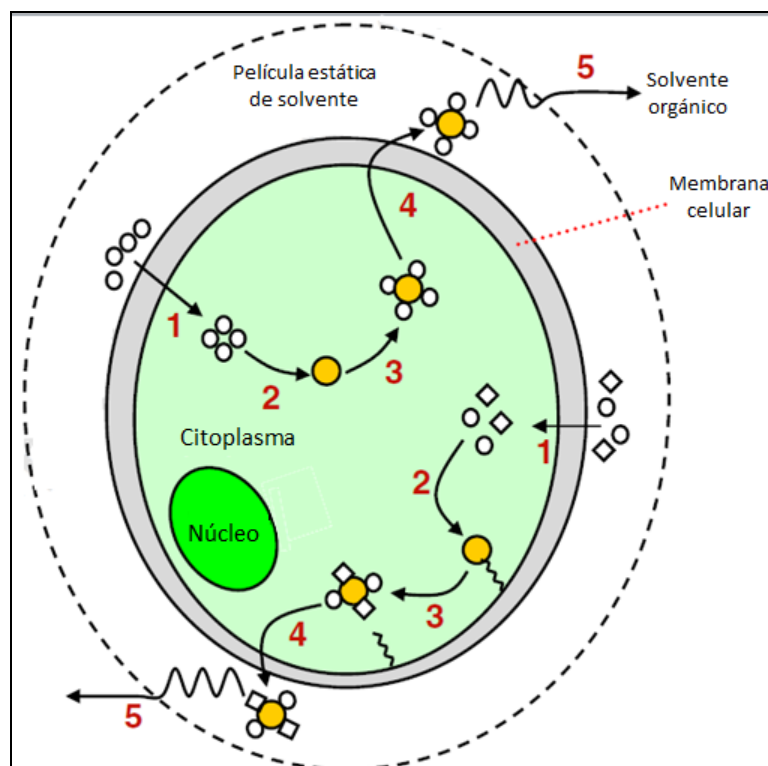


Figura 1 Mecanismo de extracción de lípidos por solventes orgánicos

Los lípidos extraídos de la biomasa (microalgas) están compuestos principalmente por triglicéridos (90-98%), mono y diglicéridos (0.1-0.5%) de ácidos grasos, y en menor cantidad de fosfolípidos, fosfátidos, carotenos, tocoferoles, compuestos de azúcar y agua (Bozbas, 2008); el perfil de ácidos grasos en las microalgas comprende moléculas saturadas (C14:0,

C15:0, C16:0, C18:0, C24:0, C25:0 y C26:0), monosaturadas (C16:1, C18:1y C20:1) y polinsaturadas (C16:2, C16:3, C16:4, C18:2, C18:3, C18:4, C18:5, C20:3, C20:4, C20:5, C22:5 y C22:6) (Abou-Shanab et al., 2011; Sydney et al., 2011; Mata et al., 2010; Spolaore et al., 2006; Dunstan et al., 1992).

La Tabla 2 presenta un análisis de diversas metodologías propuestas para llevar a cabo la extracción de los ácidos grasos. Los autores citados, en su mayoría utilizan una mezcla de solventes orgánicos, entre los cuales destacan como disolvente polar: metanol y un gran número de alternativas para el no-polar siendo el más utilizado el cloroformo. Sin embargo, no existe una homogeneidad en las condiciones de análisis, por ejemplo en la relación biomasa: solventes.

Tabla 2 Comparación de técnicas de extracción de ácidos grasos

Autor	Biomasa (g)	Solventes	Condiciones de extracción				Condiciones óptimas
			Volumen de solventes (mL)	Tiempo de reacción (min)	Temperatura de reacción (°C)	Evaporación	
(Montes et al., 2011)	100	Cloroformo: Metanol (2:1)	300	120	23	Presión reducida	Cloroformo: Metanol
		Metanol					
		Etanol					
(Wahlen et al., 2011)	0.2	Cloroformo: Metanol (2:1)	5	0.5		Argón	
(Cheng et al., 2011)	10	Agua: Metanol: Hexano (10:24:48)	82	180		Rota vapor	Agua: Metanol: Acetato de etilo (10:24:48)
		Agua: Metanol: Tolueno (10:24:48)					
		Agua: Metanol: Acetato de etilo (10:24:48)					
(Lee et al., 2010)	10	Cloroformo: Metanol (1:1)	10	2880		Rota vapor	
(Halim et al., 2011)	4g	Hexano	300	450	Ambiente		Hexano: Isopropanol (3:2)
		Hexano: Isopropanol (3:2)					

Durante la transesterificación los ácidos grasos extraídos se hacen reaccionar con un alcohol (metanol, etanol, isopropanol y butanol) convirtiéndose en ésteres de alquilo de ácido graso, en la Figura 2 se observa la reacción de un triglicérido (se obtiene a través de una reacción de esterificación entre un polialcohol y tres ácidos grasos) con un alcohol (típicamente metanol), la reacción está catalizada por un base fuerte (NaOH) o un ácido fuerte (H₂SO₄); los catalizadores alcalinos tienen velocidades de reacción superiores y altas tasas de conversión que los catalizadores ácidos (Halim et al., 2012).

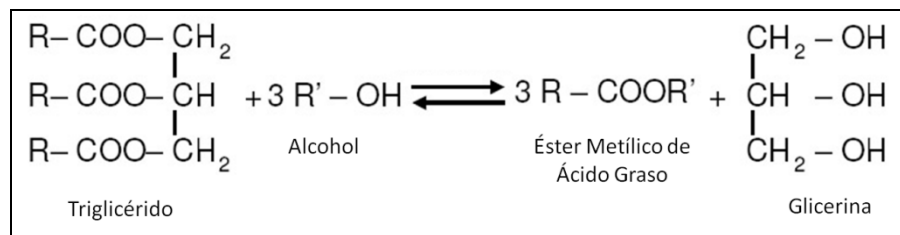


Figura 2 Reacción de transesterificación para obtener Biodiesel

La utilización de un catalizador básico en la transesterificación de lípidos provenientes de microalgas resulta inadecuada debido a la cantidad de ácidos grasos insaturados presentes en éstas, ya que dicho catalizador promovería una reacción de saponificación parcial dando como resultado la formación de jabón y dificultando la purificación del biodiesel; en contra parte los catalizadores ácidos no presentan sensibilidad al contenido de los ácidos grasos insaturados, resultando ser los adecuados para obtener biodiesel a partir de microalgas (Ehimen et al., 2010).

Al finalizar la reacción de transesterificación se cuenta con una mezcla de productos, la cual contiene biodiesel, glicerol, catalizador, exceso de alcohol y ácidos grasos sin reaccionar, por lo que se debe someter a una etapa de purificación, la cual consiste en una separación por gravedad (mediante centrifugación) para inducir la división bifásica, obteniendo en la fase superior biodiesel y en la inferior una mezcla de los productos no deseados (Halim et al., 2012).

Se realizó una revisión bibliográfica acerca de las diferentes condiciones de transesterificación (Tabla 3). Resalta la utilización del metanol como solvente para llevar a cabo la reacción de transesterificación y la utilización de un catalizador ácido.

Tabla 3 Comparación de técnicas de transesterificación en lípidos de microalgas

<i>Autor</i>	<i>Biomasa (g)</i>	<i>Solventes de extracción</i>	<i>Solvente de transesterificación</i>	<i>Condiciones de transesterificación</i>				
				<i>Volumen de solventes (mL)</i>	<i>Catalizador</i>	<i>Tiempo de reacción (min)</i>	<i>Temperatura de reacción (°C)</i>	<i>Evaporación</i>
(Montes et al., 2011)	100	Cloroformo:	Metanol	300	Ácido sulfúrico, 3-10%	240	60 - 100	Presión reducida
		Metanol						
		Etanol						
(Wahlen et al., 2011)	0.1	Cloroformo: Metanol	Metanol	2.5	Ácido sulfúrico, 1.8%	20	80	
(Lee et al., 2010)	1	Agua: Metanol: Acetato de etilo (10:24:48)	KOH-MeOH, HCl-MeOH, BF3-MeOH	30		30	100	
(Halim et al., 2011)	4	Hexano	Metanol	20	Ácido sulfúrico, 1.8%	120	55	Evaporado en estufa a 60°C
		Hexano: Isopropanol (3:2)						
(Velasquez-Orta et al., 2012)	1	Metanol: Cloroformo (1:2)	Metanol	600	NaOH, 100g/L Ácido sulfúrico	75	60	
(Ehimen et al., 2010)	15		Metanol	60	Ácido sulfúrico	240	80	

Metodología Experimental

Para evaluar el efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y en los ácidos grasos presentes en el consorcio de microalgas; muestras de agua residual con presencia de microalgas del lago Nabor Carrillo fueron sometidas a diversos procesos, Figura 3.

Para cumplir con el objetivo, las variables experimentales se establecieron con base a casos de estudios previos (Cheng et al., 2011; Cheng et al., 2010; Jeng et al., 2008). Dentro de la experimentación se mantuvieron constantes los siguientes parámetros: muestra de agua, volumen de la muestra y el flujo de gas de entrada. Como parámetros variables: concentración de ozono en fase gas a la entrada del sistema y el tiempo de operación. Durante la experimentación los factores de respuesta son: la concentración de proteína total liberada y la cantidad y abundancia relativa de los ácidos grasos.

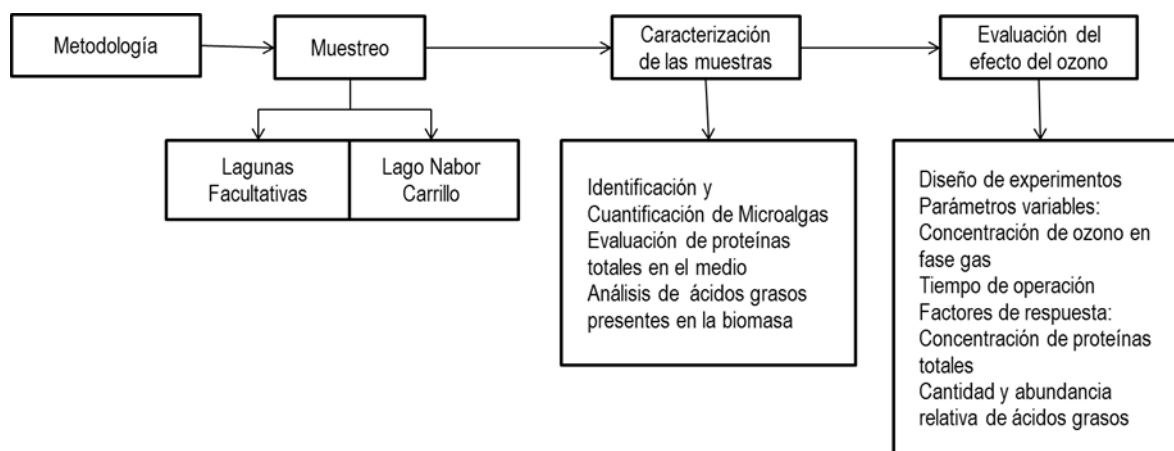


Figura 3 Diagrama general de la Metodología

Muestreo de agua con presencia de microalgas

El lago Nabor Carrillo cuenta con una configuración geométrica rectangular y las lagunas facultativas presentan la forma de un semicírculo (Figura 4), para seleccionar el punto de muestreo fue necesario realizar inicialmente un reconocimiento físico de la periferia del lago y de la planta de tratamiento. La selección del sitio se hizo en función de los altos índices de coloración verde (característico de presencia de microalgas), así como la accesibilidad para

llevar a cabo el muestreo. Cabe destacar que el muestreo se realizó durante ambas épocas del año, época cálida (Marzo a Junio) y la época fría (Octubre a Enero) con una periodicidad semanal.

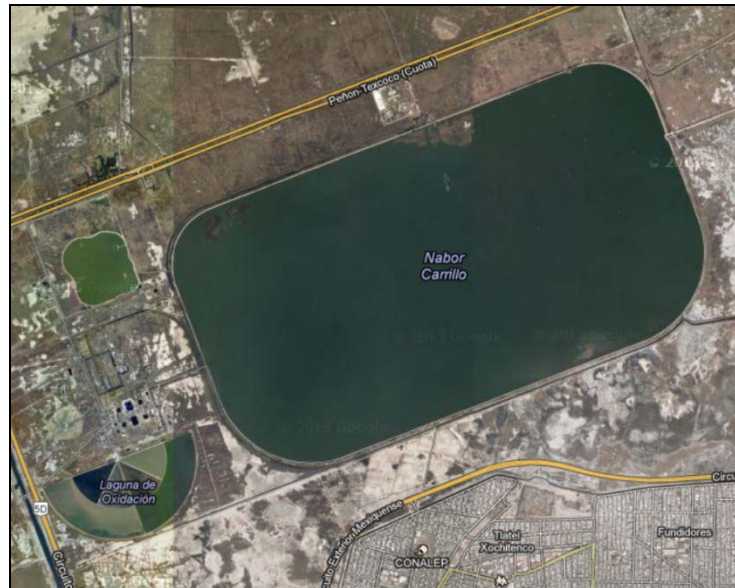


Figura 4 Ubicación geográfica del lago Nabor Carrillo

Una vez seleccionado el punto de muestreo, la toma de muestra se realizó extrayendo volúmenes de agua de la superficie del lago y colocándolos en bidones de polietileno de 20 L, el cual fue etiquetado previamente, las muestras fueron refrigeradas a 4°C hasta la realización de las pruebas.

Identificación y cuantificación de microalgas

Para la identificación de microalgas se llevaron a cabo mediante observaciones directas en un microscopio óptico Leitz Laborlux modelo 513558, utilizando los objetivos de 10x y 25x. La identificación de las microalgas se realizó mediante claves taxonómicas reportadas en la literatura (APHA-AWWA-WPCF, 1992).

El conteo de microalgas se realizó con la ayuda de una cámara de Neubauer (hemocitómetro) de la marca BRAND modelo 717820, la cual consta de un cubre objetos y porta objetos de cuarzo. La metodología empleada para realizar el conteo celular se realizó de acuerdo a técnica descrita por Granados et. al., 2004.

Pruebas experimentales de ozoflotación en muestras de agua con microalgas

Las pruebas de oxidación se llevaron a cabo utilizando el arreglo experimental de la Figura 5, conformado por un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA) con capacidad de producción de 1.9 gO₃/h, el cual utiliza aire enriquecido con oxígeno como gas de alimentación abastecido por un separador de aire (Airseo modelo AS-12, USA), un contactor gas-líquido, un analizador de ozono gas (Teledyne Instruments, USA) y una unidad de destrucción catalítica de ozono (Ozone & Control Systems INC, USA).

El contactor gas-líquido que fue utilizado para las pruebas de oxidación consta de una columna de vidrio de 1.5 L de capacidad (cuyas dimensiones son: 66 cm de altura y un radio 5 cm), adaptada para simular el proceso de ozoflotación. La columna cuenta con dos puertos de muestreo, el puerto superior se conecta hacia un dispositivo donde se colecta la espuma y se separa la biomasa alga. Dicho colector está conectado a un lavador de gases que contiene KI (2%), para cuantificar la cantidad de ozono que está saliendo del sistema sin reaccionar.

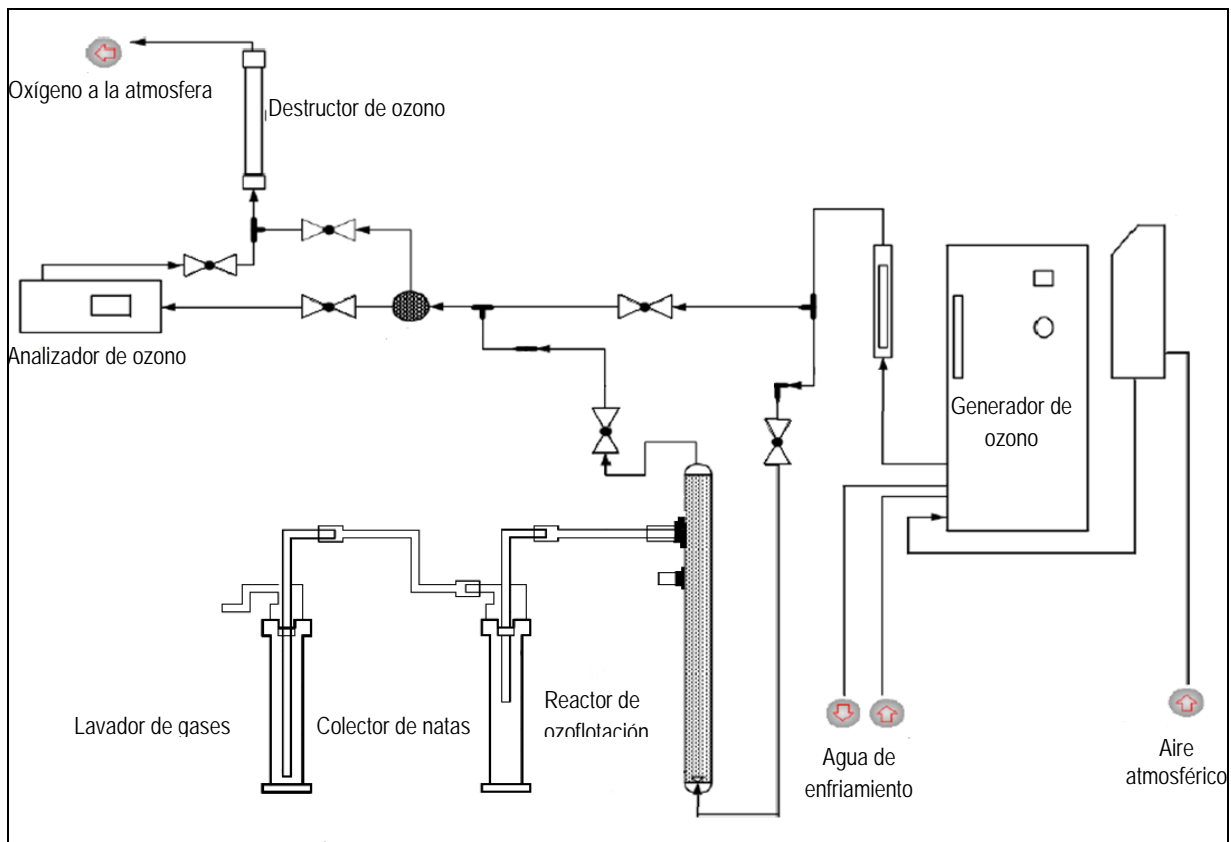


Figura 5 Componentes de la unidad de oxidación con ozono

Para las pruebas de ozoflotación se propuso trabajar como parámetros variables de experimentación la concentración de ozono gas (C_{eO_3}) en un intervalo de 3-7 mgO_3/L y el tiempo de operación (t) en 15-35 min. Se planteó un diseño de experimento rotacional compuesto de segundo orden, el cual se construye a través de un diseño factorial 2^k , donde los niveles se encuentran codificados de forma ± 1 ; así mismo está conformado por cierto número de puntos centrales (≥ 1); y finalmente cuenta con una parte axial: dos puntos axiales en los ejes correspondientes a cada uno de los factores, situados a una distancia del centro del diseño.

La Tabla 4 muestra los valores codificados y los propuestos para el diseño rotacional central compuesto, fueron contemplados 5 puntos centrales y una α de 1.68. Por otra parte, la Tabla 5 presenta las trece pruebas a realizar de forma aleatoria durante la época fría y cálida.

Tabla 4 Valores codificados y propuestos para el diseño rotacional central compuesto

<i>Variable</i>	<i>Niveles codificados</i>				
	<i>Axial inferior</i>	<i>Bajo</i>	<i>Central</i>	<i>Alto</i>	<i>Axial superior</i>
Concentración de ozono de entrada	-1.68	-1	0	1	1.68
Tiempo de ozonación	-1.68	-1	0	1	1.68
<i>Variable</i>	<i>Niveles propuestos</i>				
	<i>Axial inferior</i>	<i>Bajo</i>	<i>Central</i>	<i>Alto</i>	<i>Axial superior</i>
Concentración de ozono de entrada	2 mg/L	3 mg/L	5 mg/L	7 mg/L	8 mg/L
Tiempo de ozonación	11 min	15 min	25 min	35 min	39 min

Tabla 5 Representación matricial de las pruebas a realizar

X_1	X_2	X_1 (mg/L)	X_2 (min)
-1	-1	3	15
-1	1	3	35
1	-1	7	15
1	1	7	35
0	0	5	25
0	0	5	25
0	0	5	25
0	0	5	25
0	0	5	25
-1.68	0	2	25
1.68	0	8	25
0	-1.68	5	11
0	1.68	5	39

El trabajo experimental se inició con el montaje del arreglo experimental como lo muestra la Figura 5, estableciendo las condiciones de operación, que son:

- ✓ Flujo de gas de entrada 0.2L/min
- ✓ Volumen de muestra 900mL de agua en el reactor
- ✓ Tipo de muestra, agua del lago artificial Nabor Carrillo ubicado en la Zona del Ex-lago de Texcoco (temporadas cálida y fría)
- ✓ Concentración de ozono gas a la entrada de 3-7mg/L
- ✓ Tiempo de operación de 15-35min

Determinación de la concentración de proteína total liberada de microalgas

Alcanzado el tiempo de operación se tomó una muestra de agua de 2 mL del puerto de muestreo del reactor, se colocó en tubos Eppendor, los cuales contenían previamente 17 μ L de $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ al 0.1N, con la finalidad de neutralizar el exceso de ozono presente en el agua al momento de la toma de muestra y evitar la oxidación de la muestra. El volumen de tiosulfato fue calculado mediante la determinación de la concentración de ozono en fase líquida, método colorimétrico de índigo (APHA; AWWA; WPCF, 1992).

Después de la inactivación del ozono con tiosulfato de sodio, las muestras fueron procesadas en un sistema de filtración de 0.2 μ m de tamaño de poro, un mililitro del filtrado fue colocado en un tubo de ensaye perfectamente limpio al cual se le adicionaron 2 mL del reactivo de Biuret (Merck, 1103070500).

El método de Biuret es una técnica para la determinación de proteínas solubles, las sustancias que contienen dos o más enlaces peptídicos forman un complejo purpura-violeta con sales de cobre (II) alcalinas, el color se desarrolla por la formación de un ion coordinado, tetracúprico con dos grupos amida adyacentes.

La muestra se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente, cumplido el tiempo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. Previamente se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina de la marca Sigma-Aldrich (A2058-5G) en un intervalo de concentraciones de 0.01-1 g/L.

La espuma colectada fue reservada para su posterior análisis. Y finalmente se realizó la titulación del KI que se encontraba en el lavador de gases que estaba conectado al colector de natas, obteniendo así la cantidad de ozono que no fue transferido durante la prueba.

Extracción y transesterificación de ácidos grasos presentes en microalgas

Extracción de ácidos grasos

La evaluación del efecto del oxidante en la extracción de ácidos grasos presentes en la biomasa de microalgas, se realizó comparando cualitativamente los FAME obtenidos a partir de la biomasa sometida al efecto del oxidante, con los FAME obtenidos de biomasa no sometida al proceso de ozonación.

Para el desarrollo de la metodología de extracción de los ácidos grasos, en la presente tesis los solventes seleccionados fueron una mezcla de metanol: cloroformo (1:2, v/v). Durante la extracción, la biomasa es expuesta a una mezcla de disolventes que extraen los lípidos de las matrices celulares. Para ello fue necesario acondicionar la biomasa microalgal: tanto la biomasa sometida sin tratamiento como la sometida al proceso de oxidación, fueron centrifugadas a 3,000 rpm (15min) hasta obtener un precipitado verde, el cual fue colocado en una placa de vidrio para el proceso de deshidratación (Figura 6).



Figura 6 Concentrado de microalgas

El concentrado de biomasa fue deshidratado en una estufa durante 90 min a una temperatura de 50°C, posteriormente se retiró con mucha precaución la biomasa seca, con la finalidad de tener la menor pérdida posible, el polvo de biomasa fue reservado hasta su utilización para el proceso de extracción.

La extracción de los ácidos grasos propiamente, se llevó a cabo colocando un gramo de biomasa seca en un matraz Erlenmeyer de 125 mL (perfectamente limpio y enjuagado con metanol), al cual se le añadieron 20 mL de cloroformo (J.T. Baker 9180-03) y 10 mL de metanol (J.T. Baker 9070-03), el matraz se selló con papel parafilm y se colocó en un agitador orbital durante 24 h a 140 rpm.

Después de este tiempo se procedió a realizar una extracción líquido-líquido. Para ello la biomasa con la mezcla de disolventes fue centrifugada durante 10 min a 3,000 rpm. El precipitado se desechó y el sobrenadante se reservó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL que posteriormente fue colocado en un embudo de separación, al cual se agregaron 15 mL de una solución de cloruro de potasio (J.T. Baker 3040-500) al 0.88%. Se separaron las fases acuosas (superior) y orgánica (inferior), se conservó la fase orgánica.

Los ácidos grasos extraídos de las microalgas se encuentran dentro de la fase orgánica, por lo que para llevar a cabo la cuantificación de estos, la fase orgánica se depositó en un matraz Erlenmeyer previamente pesado (peso constante), en el cual el solvente se evaporó a presión reducida y la cantidad de ácidos grasos extraídos se obtuvo mediante diferencia de pesos (Ec. 3).

$$AcG_{(g)} = Matraz_{final} - Matraz_{inicial} \quad Ec. 3$$

Dónde:

$AcG_{(g)}$: Ácidos grasos obtenidos en gramos

$Matraz_{final}$: Peso del matraz al final de la prueba en gramos

$Matraz_{inicial}$: Peso del matraz al inicio de la prueba en gramos

Transesterificación de ácidos grasos

Seguido a la extracción de lípidos a partir de microalgas, es necesario un proceso de conversión para producir biodiesel, debido a que la viscosidad del aceite extraído es demasiado alta para que se pueda utilizar directamente como combustible; es por ello que se utiliza la transesterificación para reducir la viscosidad (Kim et al., 2013).

La transesterificación de los lípidos totales, se realiza en función a la relación estequiometría de dicha reacción. Autores como Montes (2010) consideran una relación molar metanol: lípidos totales de 30:1 que se encuentra en función de la estequiometría de la reacción química y considerando un exceso en 10 veces, considerando un peso molecular de los lípidos totales de 840 g/mol. Con base en estas consideraciones se planteó la siguiente metodología para realizar la transesterificación:

De acuerdo a la cantidad de lípidos extraídos se realizó el siguiente cálculo (Ec. 4), obteniendo así el volumen del metanol.

$$X_g \text{ ÁcG} * \frac{1 \text{ mol AcG}}{840 \text{ g AcG}} * \frac{30 \text{ mol MeOH}}{1 \text{ mol AcG}} * \frac{32 \text{ g MeOH}}{1 \text{ mol MeOH}} * \frac{1 \text{ mL MeOH}}{0.79 \text{ g MeOH}} * 4 = Y \text{ mL MeOH} \quad \text{Ec. 4}$$

Dónde:

$X_g \text{ ÁcG}$: Gramos de ácidos grasos extraídos

$Y \text{ mL MeOH}$: Mililitros de metanol que adicionar

El volumen de metanol calculado se agrega a los lípidos los cuales se mantuvieron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, de igual forma se adiciono el 1.8% del volumen calculado pero de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (0.04N) (Wahlen et al., 2011); las muestras se dejaron reaccionar durante 24 h en un agitador oscilatorio.

Los ácidos grasos con metanol y H_2SO_4 se dejaron reaccionar durante 24 h en un agitador oscilatorio para posteriormente evaporar hasta obtener un volumen final de 2 mL el cual se centrifugó durante 30 min a 5,000 rpm, eliminando así impurezas y el glicerol formado durante la transesterificación. Las muestras se conservaron a 4°C, para su posterior análisis cualitativo mediante cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM).

Para la identificación de los FAME se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6809, acoplado a un espectrofotómetro de masas Agilent Technologies 5973. La detección de los FAME se hizo a través de una columna de separación DB-5ms de sílice fundido con una longitud de 30 metros, un diámetro interno de 0.25mm y un espesor de película de 0.25 μm . El gas acarreador para el análisis fue helio con 99.9995% de pureza.

Condiciones de operación del CG-EM: la temperatura del inyector fue de 250°C, con una inyección tipo Split; el espectrofotómetro de masas se programó a una temperatura de 280°C. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: temperatura inicial 85°C (5 min) con una rampa de 7°C/min, hasta llegar a 265°C (10 min). Para la identificación de los FAME el espectrofotómetro opero en modo SCAN a 50-550m/z.

Los datos obtenidos se registraron y presentaron como un cromatograma a través de un software especializado (Hewlett Packard Chemstation versión B.02.05). De igual forma el software cuenta con programa de integración, detección de picos, corrección de líneas base y cálculos finales de abundancia (área bajo la curva).

Con la finalidad de corroborar las condiciones de operación y los resultados obtenidos, los FAME fueron identificados comparando el tiempo de retención con un estándar conocido de 26 auténticos ésteres metílicos para la identificación de bacterias SUPELCO 4-7080 diluidos en metil caproato, que se analizaron bajo las mismas condiciones de las muestras. La Figura 7 muestra el cromatograma de los FAME del estándar utilizado, donde se pueden apreciar picos definidos para cada uno de estos.

File :C:\msdchem\1\DATA\FAMESTD270612-3.D
Operator : MARIA TERESA VALERIANO
Acquired : 27 Jun 2012 11:58 using AcqMethod FAME.M
Instrument : MSD
Sample Name: ESTANDAR FAME DILUIDO EN METANOL
Misc Info : PRUEBA DE METODOLOGIA FAME
Vial Number: 1

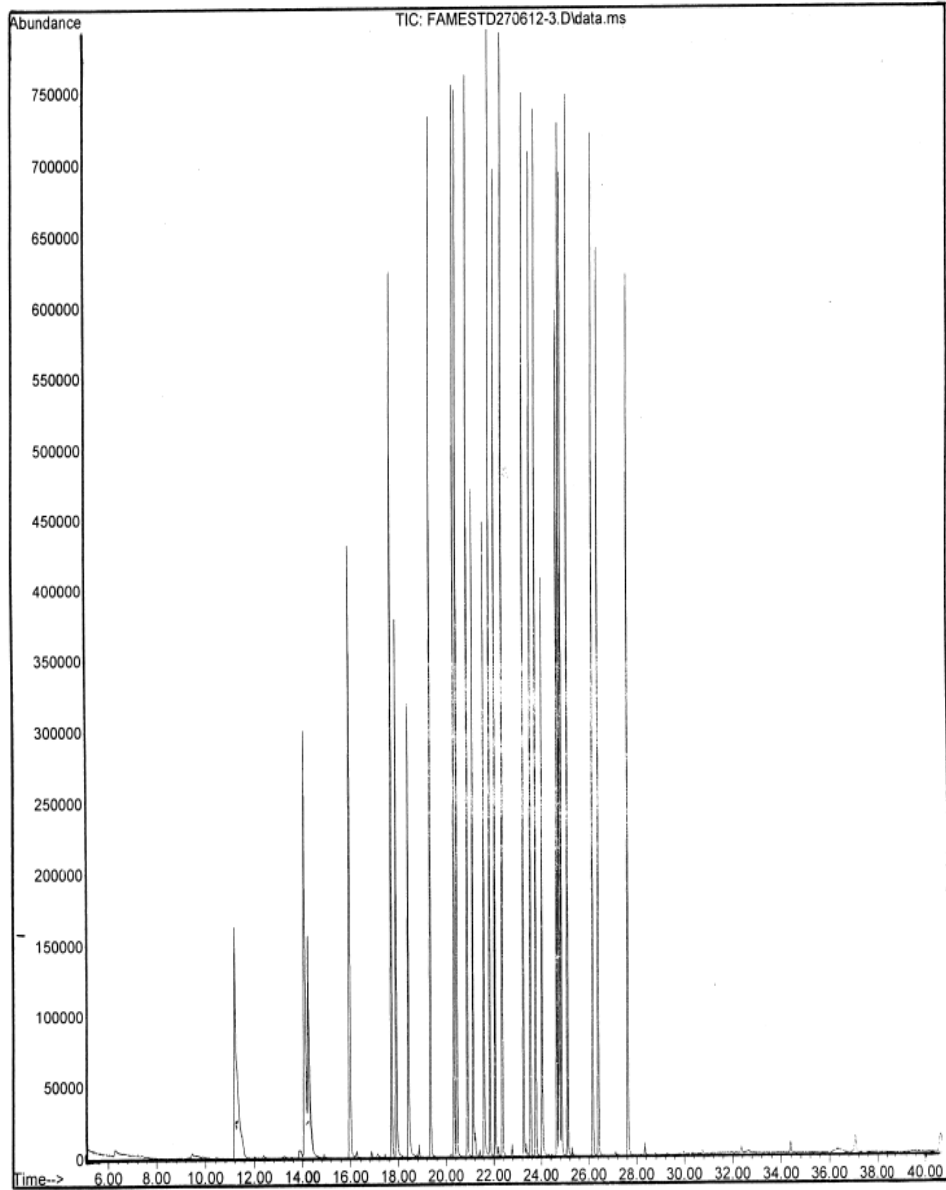


Figura 7 Cromatograma de los metil ésteres de ácidos grasos, para identificar bacterias: Bacterial Acid Methyl Esters CP TM Mix. SUPELCO 4-7080

Resultados y Análisis

Identificación y cuantificación de las microalgas presentes en el lago Nabor Carrillo

De la evaluación visual realizada al inicio del proyecto se seleccionó como sitios de muestreo el embarcadero del lago Nabor Carrillo (19.48°07'56" N, 98.95°99'57"O) y la laguna secundaria de la planta de tratamiento (19.45°31'13"N, 98.99°11'52"O). En este estudio se efectuaron 7 muestreos para la época cálida y 10 para la época fría, por lo cual todos los experimentos se realizaron con muestras frescas correspondientes al muestreo.

Se realizó el conteo de microalgas en muestras de agua del lago Nabor Carrillo y de las lagunas facultativas respectivamente para ambas épocas, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 6 (valor promedio de los muestreos realizados para cada época del año), con base a estos resultados se seleccionó para el estudio, el agua del lago Nabor Carrillo por su mayor contenido de algas (Figura 8).

Tabla 6 Conteo promedio de microalgas en el lago Nabor Carrillo y en las Lagunas facultativas

	<i>Lago Nabor Carrillo</i> # microalgas/mL	<i>Lagunas facultativas</i> # microalgas/mL
Época cálida	2.62x10 ⁷	3.2 x10 ⁵
Época fría	6.08x10 ⁶	1.07 x10 ⁴



Figura 8 Sitio de muestreo en el lago Nabor Carrillo

Se lograron identificar 19 géneros de microalgas en el agua del lago Nabor Carrillo, los generos más abundantes para ambas épocas del año fueron *Oscillatoria sp*, *Arthrospira sp* y *Spirulina sp* (Figura 9). Estas microalgas no están reportadas en la literatura como potenciales productoras de precursores de biodiesel, en el caso de la *Spirulina sp* es utilizada para la acuicultura debido a su alto contenido proteínico (60-70% en peso seco) (Vonshak & Richmond, 1988).

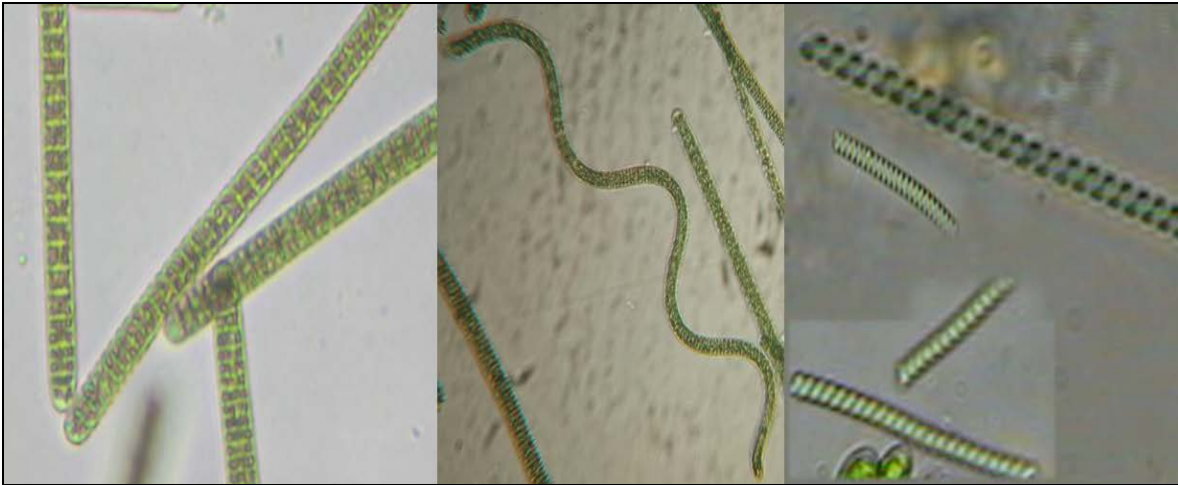


Figura 9 Géneros predominantes de microalgas: *Oscillatoria* sp; *Asthrospira* sp. y *Spirulina* sp

Los dieciséis géneros de microalgas que se identificaron en menor concentración fueron: *Actinastrum lagerheim*, *Anabaena* sp, *Anacystis* sp, *Chlorella* sp, *Chlorofita*, *Chlamydomona* sp, *Coelastrum nageli*, *Cyclotella* sp, *Desmodesmus* sp, *Diatomea* sp, *Euglena* sp, *Merisopedia* sp, *Microsystis* sp, *Pediastrum* sp, *Phacus* sp y *Scenedesmus* sp (Figura 10).

Con la finalidad de identificar aquellos géneros de microalgas con mayor potencial para producir biodiesel. Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre el contenido lipídico y proteínico de los géneros de microalgas encontradas en el agua del lago Nabor Carrillo. No obstante a que no hay información al respecto para la mayor parte de los géneros identificados, la información recabada (Tabla 7), indica que las especies con alto contenido de lípidos y por lo tanto son candidatas a cultivarse en agua residual para la producción de biodiesel son *Chlorella* sp (10-57% lípidos) y *Cyclotella* sp (42% lípidos) (Kirrolia et al., 2013; Amaro et al., 2011; Demirbas, 2011; Mata et al., 2010; Spolaore et al., 2006).

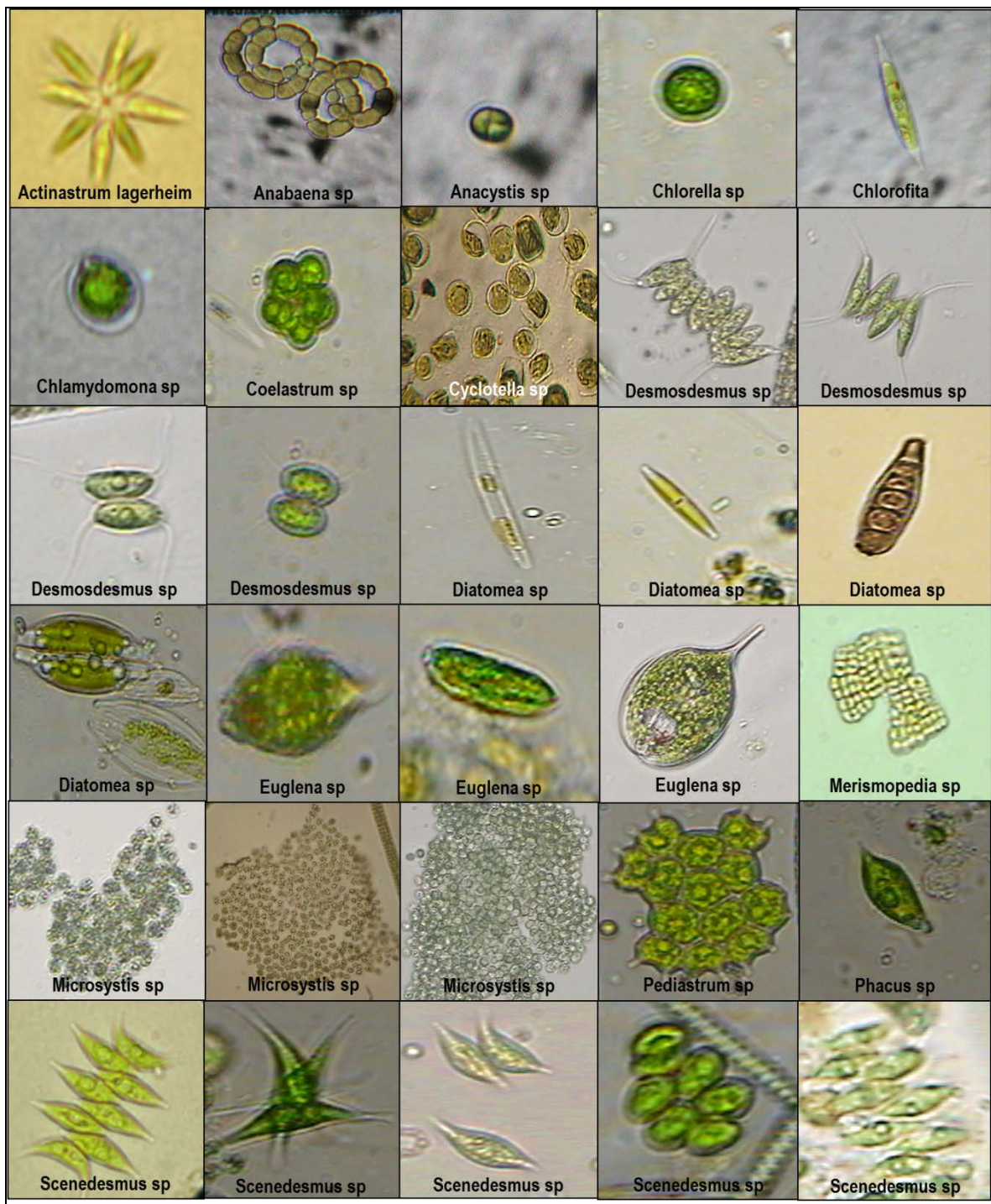


Figura 10 Géneros de microalgas encontradas en las muestras del agua del lago Nabor Carrillo

Tabla 7 Contenido lipídico y proteínico de las microalgas encontradas en el lago Nabor Carrillo

Género	Contenido de aceite (% peso seco)	Contenido proteínico (% peso seco)	Organismo	Referencia
<i>Anabaena sp</i>	4-7.5	43-56	Cianobacteria	(Spolaore et al., 2006)
<i>Arthrospira sp</i>	8	25	Cianobacteria	(Mendes et al., 2006)
<i>Chlorella sp</i>	10-57	51-58	Alga verde	(Kirrolia et al., 2013; Amaro et al., 2011; Demirbas, 2011; Mata et al., 2010)
<i>Chlamydomona sp</i>	21	48	Alga verde	(Spolaore et al., 2006)
<i>Cyclotella sp</i>	42	-	Diatomea	(Spolaore et al., 2006)
<i>Desmodesmus sp</i>	20	10-20	Alga verde	(Kramárová et al., 2012; Pan et al., 2011)
<i>Euglena sp</i>	14-20	-	Euglenofita	(Mata et al., 2010)
<i>Scenedesmus sp</i>	9.5-21.1	50-56	Alga verde	(Amaro et al., 2011; Mata et al., 2010)
<i>Spirulina turpin ex gomont</i>	4-16.6	60-70	Cianobacteria	(Amaro et al., 2011; Mata et al., 2010; Harun et al., 2010)

Para entender los resultados obtenidos en éste trabajo de investigación es importante mencionar que las cianobacterias tienen un alto contenido proteína alrededor del 70% peso seco y un bajo contenido de lípidos del 5% peso seco. Las algas verdes tienen un mayor tamaño que las cianobacterias, son organismo eucariontes de alto contenido de lípidos (10-57% peso seco) y de proteínas (10-50% peso seco); se favorece su reproducción a condices bajas de temperatura por ejemplo en el invierno. Las algas verdes se consideran las principales especies para la producción de biodiesel (ZHU et al., 2013; Godos et al., 2009).

Efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y su relación con la recuperación de biomasa

En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos para dos muestras de agua. En la primera se utilizó aire como gas de dispersión (11a) y en la segunda ozono (11b), durante la flotación con el oxidante se generó la formación de una espuma de mayor volumen, rígida y con mayor tiempo de vida útil, la cual no fue obtenida cuando se utilizó aire; así mismo es importante mencionar que durante las pruebas realizadas con aire no se obtuvo cosecha de microalgas.

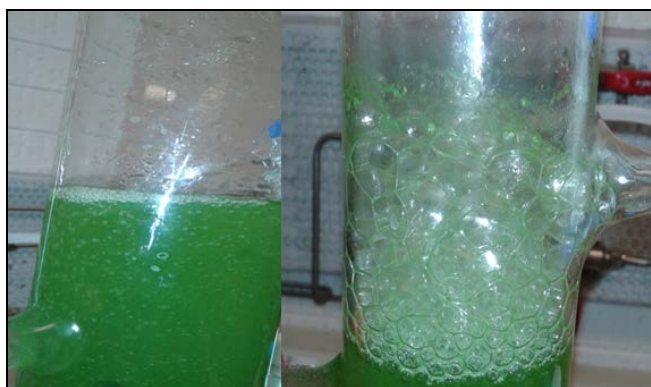


Figura 11 Comparación del proceso de flotación con aire (a) y con ozono (b) respectivamente durante la recuperación de biomasa de microalga

De igual forma se evaluó la concentración de proteína total liberada en función del tiempo (Figura 12), para una muestra de agua que fue flotada con aire y una con ozono, en ambas muestras se aprecian variaciones en la concentración de la proteína liberada. La muestra flotada con aire no presenta una clara tendencia en la concentración de proteína total liberada.

Al inicio del proceso de ozoflotación se presenta una disminución en la concentración de la proteína total presente en las muestras de agua, después tiene a incrementarse por la liberación proteína total generada por la lisis celular de las microalgas. A mayores dosis y/o tiempo de operación se puede presentar nuevamente una disminución por la misma razón al inicio del tratamiento.

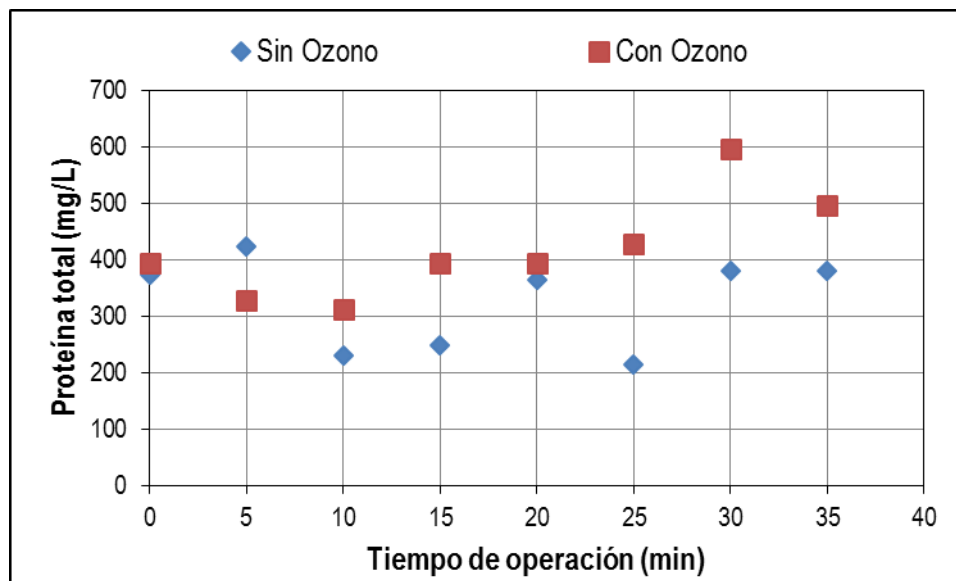


Figura 12 Comparación del contenido proteínico liberado de las microalgas utilizando ozono y aire, como método de separación

Como se observó en la gráfica anterior la flotación con aire no promueve la liberación de proteína intracelular, por lo tanto no produce un efecto de separación entre la biomasa y el medio acuoso, estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Cheng et al., 2011; Cheng et al., 2010). Además, del análisis estadístico realizado se obtuvo que existe una diferencia significativa entre las concentraciones de proteína total liberada por ambos gases ($p\text{-value}=0.055$, Anexo 1).

Por otra parte, el ozono tiene dos efectos importantes durante la separación, (1) al ser un oxidante fuerte lleva a cabo la lisis celular, permitiendo la liberación de proteína total, y (2) la reacción que existe entre el ozono y las proteínas liberadas, tiene como consecuencia la formación de una espuma con mayor estabilidad, la cual favorece el proceso de flotación permitiendo la separación y cosecha de las microalgas.

Para evaluar el efecto que tiene el ozono sobre la liberación de proteínas totales intracelulares se realizó la cuantificación de éstas para cada una de las concentraciones del oxidante en el gas de entrada y cada uno de los tiempos de ozonación que se establecieron para el diseño de experimentos (Tabla 5).

La Figura 13 muestra el modelo de superficie de respuesta obtenida para cada época del año.

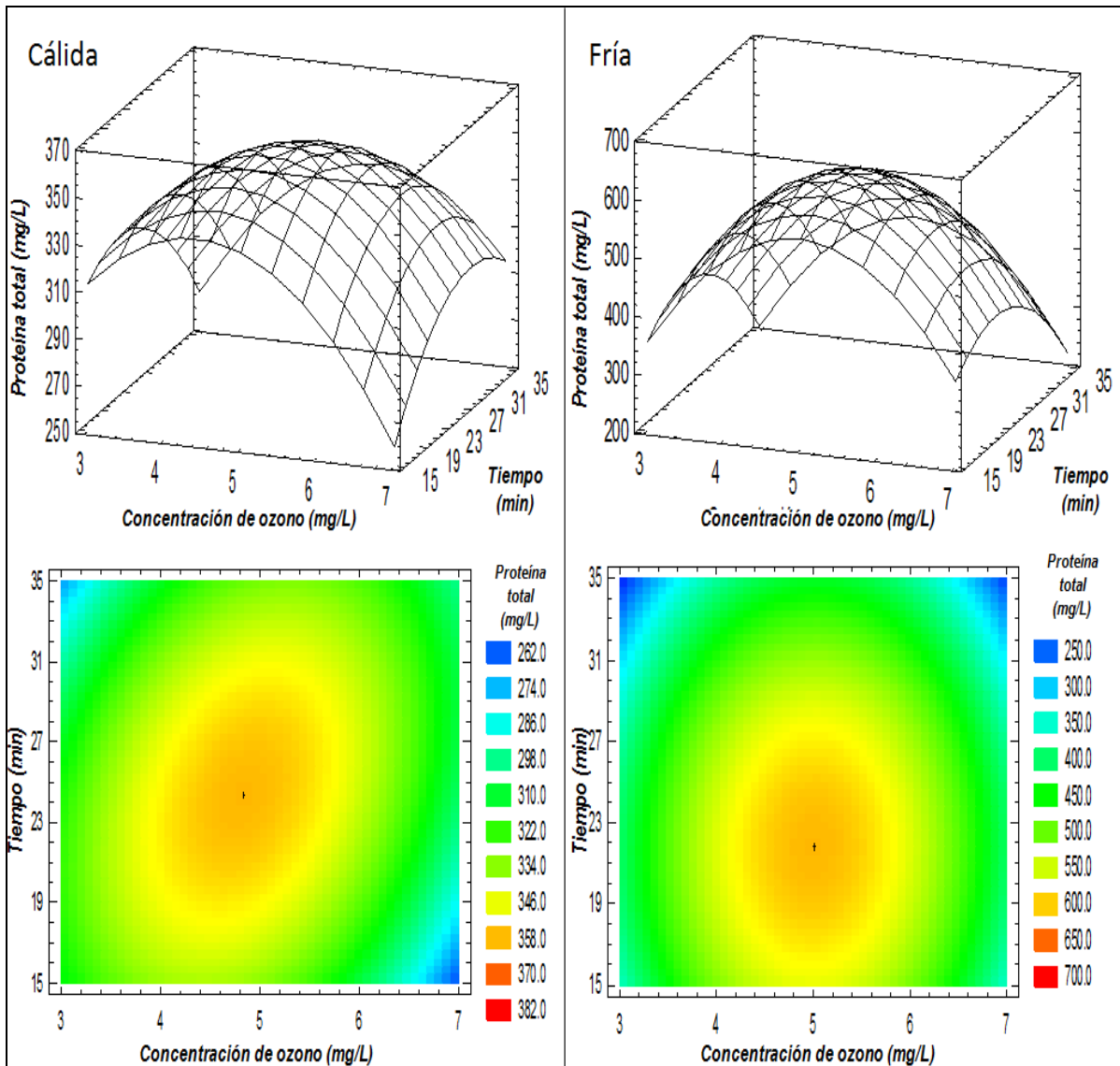


Figura 13 Superficies de respuesta obtenidas para la liberación de proteínas totales por efecto del ozono

En el comportamiento resultante para ambas épocas del año, con respecto a la liberación de proteínas totales indica, que hay una concentración de ozono en fase gas y un tiempo de ozoflotación, en los cuales ocurre una máxima liberación de proteínas, valores superiores a

dichas condiciones empieza a experimentar una desnaturalización de la proteína liberada teniendo como consecuencia la disminución de la concentración.

Las ecuaciones del modelo de superficie de respuesta que describen la liberación de proteínas están descritos por las ecuaciones 5 y 6, para la época cálida y la época fría respectivamente. Cabe destacar que dichos modelos se utilizan para predecir los resultados que arrojarían otras condiciones de operación que no fueron trabajadas, sin embargo, es importante mencionar que los modelos obtenidos en éste trabajo de investigación se limitan al rango de las condiciones de operación estudiadas.

$$PT = 48.72 + 90.14Cge_{O_3} + 7.47t - 11.93Cge_{O_3}^2 + 1.03Cge_{O_3}t - 0.25t^2 \quad Ec.(5)$$

$$PT = -1,176.32 + 522.76Cge_{O_3} + 43.65t - 52.77Cge_{O_3}^2 + 0.25Cge_{O_3}t - t^2 \quad Ec.(6)$$

Dónde:

PT: Proteína total (mg/L)

Cge_{O₃}: Concentración de ozono gas a la entrada (mg/L)

t: Tiempo (min)

De acuerdo al análisis estadístico (Anexo 1) para la época cálida se observa que en orden de importancia las interacciones Cge_{O₃}: Cge_{O₃} y t:t presentan una influencia significativa sobre el valor de la concentración de proteína total liberada. Para la época fría solo la interacción Cge_{O₃}: Cge_{O₃} presenta una diferencia significativa.

El máximo de proteína total liberada para la época cálida fue de 357.65mgPT/L, con una Cge_{O₃} de 4.83 mgO₃/L y tiempo de 24.3 min, (Dosis aplicada de ozono (DAO) de 26.13 mgO₃/L de agua); el máximo de la época fría fue de 607.7 mgPT/L, con una Cge_{O₃} de 5.0 mgO₃/L y 21.82 min (DAO de 24.35 mgO₃/L de agua).

La Tabla 8 presenta el delta de proteína total liberada para muestras de microalgas cosechadas en de cada época del año, donde se puede apreciar que la mayor liberación por miligramo de ozono aplicado ocurre en la época fría. Se esperaba una mayor cantidad de proteína total liberada para la época cálida, debido a una mayor presencia de cianobacterias con alto contenido de proteína (70% peso seco). Los resultados obtenidos de mayor

contenido de proteína total en la época fría, puede probablemente estar asociado, entre otros factores, a la calidad del agua de la muestra y a la demanda de ozono, la cual se traduce en una mayor DAO para la época cálida.

Tabla 8 Máxima liberación de proteína total

Época	$PT_{inicial}$ (mg/L)	$PT_{máxima liberada}$ (mg/L)	DAO (mg/L)	ΔPT	mgPT/mgO ₃
Cálida	283.43mgPT/L ±23	357.65mgPT/L	26.13mgO ₃ /L	74.57	2.85
Fría	436.59mgPT/L ±71	607.7mgPT/L	24.35mgO ₃ /L	171.11	7.02

ΔPT : $PT_{máxima liberada} - PT_{inicial}$

mgPT/mgO₃: Miligramos de proteína total por cada miligramo de ozono aplicado

Por otra parte, se analizó la posible relación que existe entre la proteína liberada y la biomasa recuperada (peso seco). En la Figura 14 se observa que no existe una relación directa entre la concentración de la proteína liberada y la biomasa recuperada.

La concentración de la proteína en función de la DAO presenta incrementos y decrementos que se hacen menos evidentes conforme aumenta la dosis de ozono; caso contrario el valor de la biomasa recuperada aumenta con la DAO.

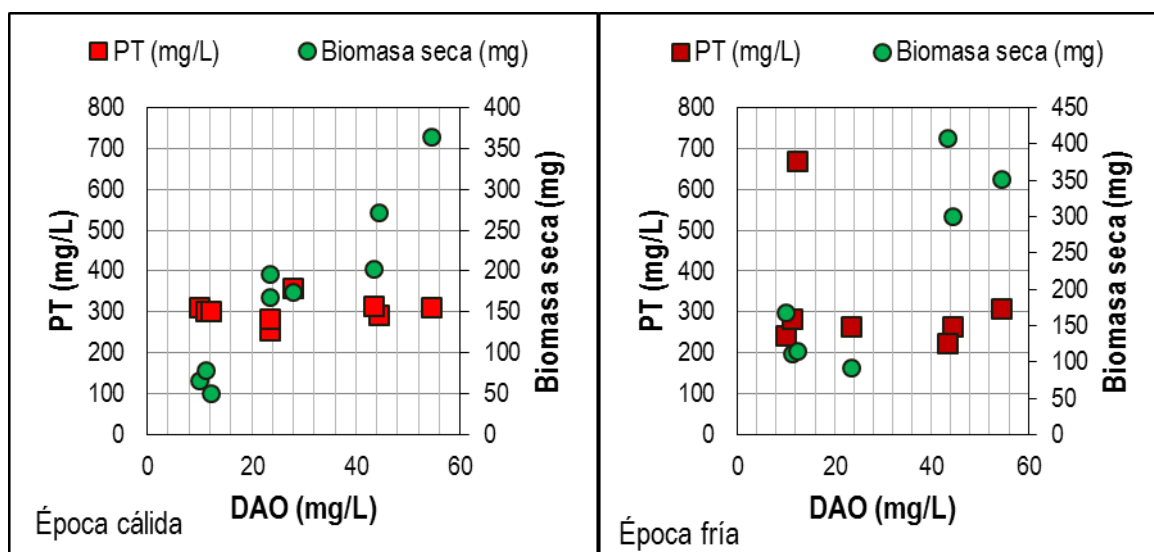


Figura 14 Relación entre la proteína total liberada y la biomasa seca, en función de la DAO

Efecto del ozono en la recuperación de biomasa seca

Anteriormente se evidenció que la biomasa algal en una muestra de agua se puede recuperar mediante ozoflotación, es por ello que se evaluó el efecto de la concentración de ozono sobre la eficiencia de recuperación, obteniéndose como modelo de superficie de respuesta el presentado en la Figura 16. Las ecuaciones que describen dichas superficies son 7 y 8, para la época cálida y la época fría respectivamente.

$$BS = -38.72 - 28.32C_{geO_3} + 8.11t + 4.72C_{geO_3}^2 + 0.83C_{geO_3}t - 0.11t^2 \quad \text{Ec. (7)}$$

$$BS = 859.32 - 136.4C_{geO_3} - 46.46t + 11.12C_{geO_3}^2 + 2.55C_{geO_3}t - 0.8t^2 \quad \text{Ec. (8)}$$

Dónde:

BS: Biomasa seca (mg/L)

C_{geO_3} : Concentración de ozono gas a la entrada (mg/L)

t: Tiempo (min)

Para ambas épocas del año se encontró que existe una relación directamente proporcional entre la recuperación de biomasa y la concentración de ozono gas a la entrada, la cual se mejora si se utilizan tiempos de operación prolongados (dichos parámetros generan una diferencia significativa, Anexo 1), lo cual se traduce en un incremento en la dosis aplicada de ozono, es decir la recuperación de la biomasa depende directamente a la DAO como se muestra en la Figura 15.

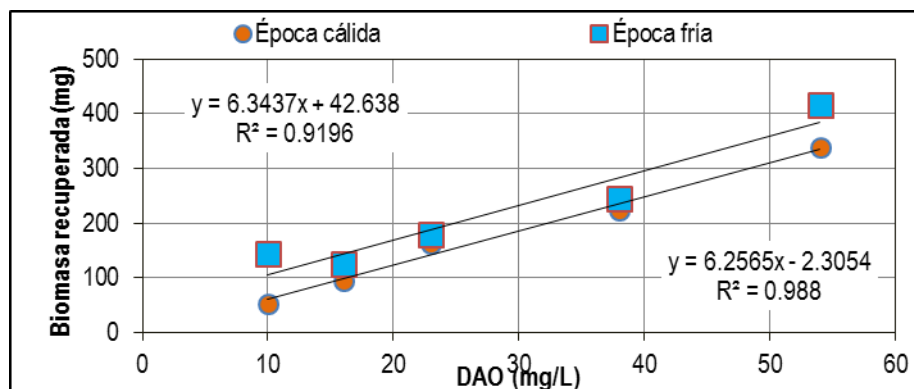


Figura 15 Relación entre la biomasa recuperada y la dosis aplicada de ozono

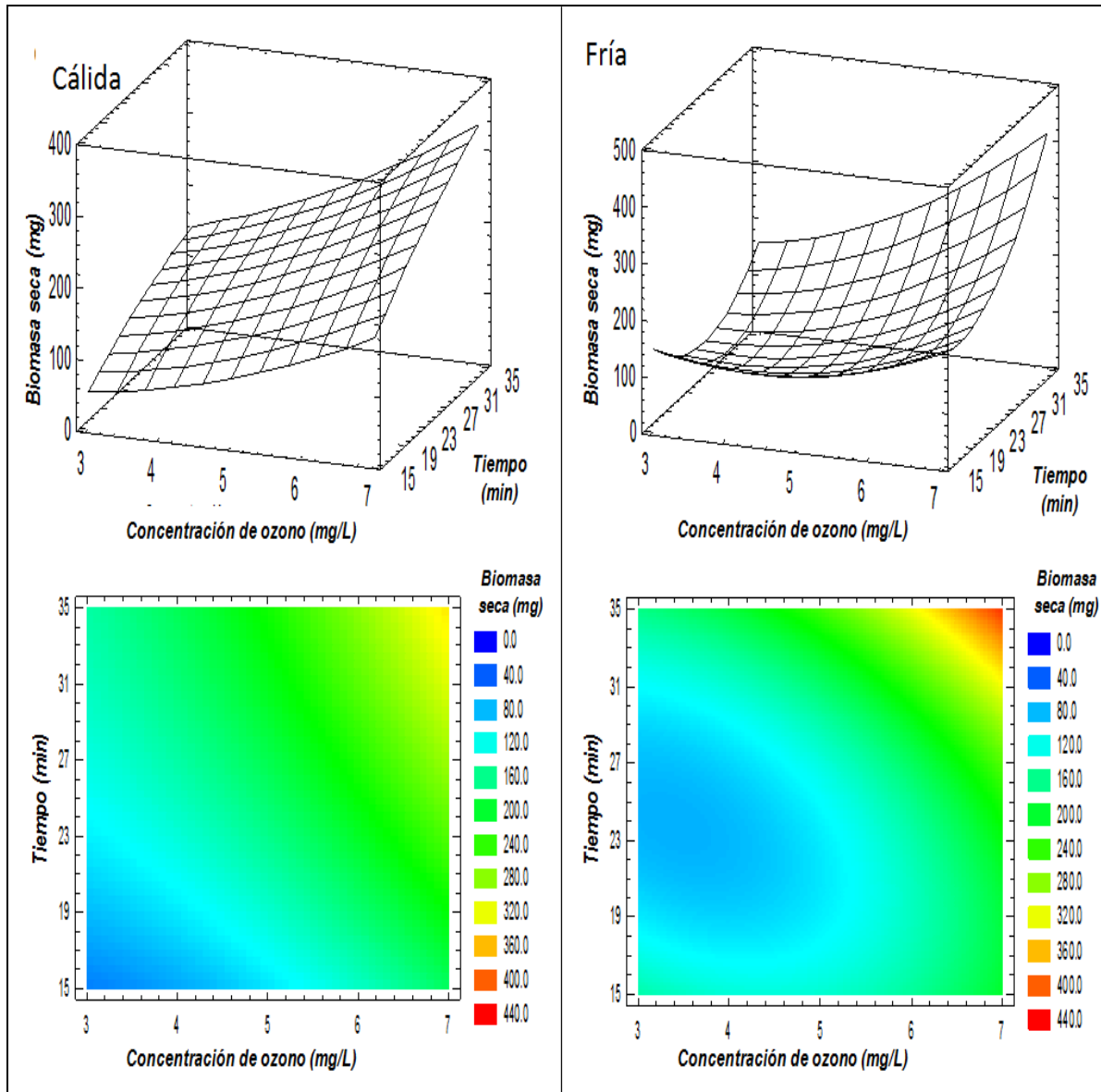


Figura 16 Superficies de respuesta obtenidas para la recuperación de biomasa (peso seco) en función del ozono

Cheng et al. (2010, 2011) obtuvieron valores satisfactorios de flotación de biomasa algal con ozono, reportando remociones de 98% y 95% en cultivos puros de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* FSP-3 con dosis de 0.024 mgO₃/mg biomasa y 0.52 mgO₃/mg biomasa, respectivamente. Estos resultados

son comparables con lo obtenido en el presente trabajo de investigación, en donde se lograron remociones de biomasa algal hasta del 100% con dosis de ozono de 0.13 mgO₃/mg biomasa a partir de un consorcio de microalgas nativas (en su mayoría *Oscillatoria sp*, *Arthrospira sp* y *Spirullina sp*) desarrollado en aguas residuales tratadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el modelo de superficie de respuesta se seleccionaron las concentraciones de ozono gas a la entrada de 3, 5 y 7 mgO₃/L y los tiempos de 15 y 35 min, con la finalidad de observar el efecto del ozono en el porcentaje de recuperación de biomasa, para ello se calcularon los porcentajes de recuperación, los cuales están basados en el contenido de biomasa de una muestra del lago Nabor Carrillo (determinación experimental), el resultado obtenido fue de 404.63±30 mg biomasa en peso seco por cada 900 mL de muestra del lago.

La Figura 17, muestra el porcentaje de recuperación de la biomasa presente en una muestra del lago; Como se esperaba, la mayor recuperación de biomasa se presenta con DAO altas. Sin embargo, el análisis de varianza demuestra que los porcentajes de recuperación de biomasa no son significativamente diferentes para cada época del año (p-value= 0.53, Anexo 1). DAO superiores al 38.9 mgO₃/L generan un porcentaje de recuperación mayor al 50%, para ambas épocas del año.

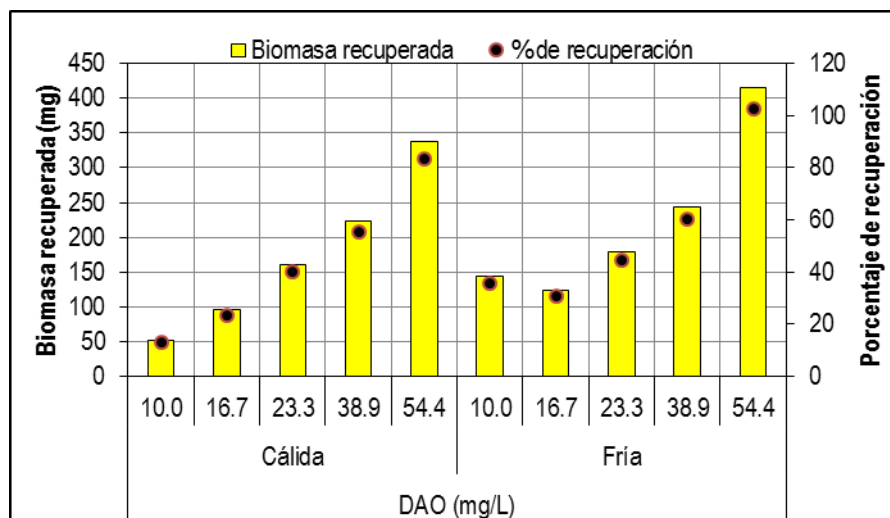


Figura 17 Efecto del ozono en la recuperación de biomasa algal (peso seco)

Se realizó un análisis de miligramos de biomasa seca recuperados por miligramo de ozono aplicado (Tabla 9); del balance de masa se obtuvo que la DAO de 23.33 mgO₃/L de agua, recuperó mayor cantidad de biomasa para ambas épocas del año.

Asimismo en la Tabla 9 se puede observar que el aumento en la DAO es favorable para la recuperación de la biomasa algal, sin embargo, genera un mayor gasto de ozono y una disminución en la utilización de ozono.

Tabla 9 Efecto de la DAO en la recuperación de la biomasa

<i>Época del año</i>	<i>DAO (mg/L)</i>	<i>Biomasa seca (mg)</i>	<i>% recuperación</i>	<i>mgBS/mgO₃</i>
Cálida	10.00	52.63	13.0	5.26
	16.67	95.38	23.5	5.72
	23.33	161.53	39.9	6.92
	38.89	223.60	55.2	5.75
	54.44	337.53	83.4	6.20
Fría	10.00	143.99	35.5	14.40
	16.67	124.50	30.7	7.47
	23.33	179.51	44.3	7.69
	38.89	243.59	60.2	6.26
	54.44	416.07	102.8	7.64

mgBS/mgO₃: Miligramo de biomasa seca recuperada por cada miligramo de ozono aplicado

Efecto del ozono en la composición de ácidos grasos presentes en microalgas

Para este trabajo de investigación en el cual se sometió la biomasa a la acción de un fuerte oxidante, es importante evaluar la acción del ozono sobre los ácidos grasos ya que son la materia prima para la producción de biodiesel. El primer efecto que se observó fue el daño que produce el oxidante sobre la pared celular de las microalgas de ambas épocas del año, el cual se ve reflejado en la facilidad de extracción de los ácidos (Figura 18).

Se encontró que el ozono afecta de forma distinta a las microalgas de cada época del año, para la época cálida se logró extraer 45.86mgAcG a una DAO 33.91 mgO₃/L de agua. Para la época fría se obtuvo un máximo de extracción de 50.71mgAcG con una DAO de 23.42 mgO₃/L de agua.

Se hizo una comparación entre los ácidos grasos extraídos antes y después del proceso de separación mediante ozoflotación, y se puede observar que el proceso de separación aporta un efecto de pre-tratamiento, con el cual se logran un incremento en la extracción de aproximadamente el 100% (Tabla 10).

Tabla 10 Incremento en la cantidad de ácidos grasos extraídos por efecto del ozono

<i>Temporada</i>	<i>Sin ozono</i>	<i>Con ozono</i>	<i>Incremento</i>
Cálida	22.8 mgÁcG	45.86mgÁcG	101%
Fría	27.8mgÁcG	50.71mgÁcG	82%

Las ecuaciones que describen los modelos de superficie encontrados para las diferentes épocas del año son: Época cálida (Ec. 9) y Época fría (Ec. 10).

$$\hat{ÁcG} = -134.4 + 33.15C_{O_3} + 6.44t - 3.09C_{O_3}^2 + 0.027C_{O_3}t - 0.11t^2 \quad \text{Ec. (9)}$$

$$\hat{ÁcG} = -63.32 + 16.45C_{O_3} + 4.07t - 0.06C_{O_3}^2 - 0.8C_{O_3}t + 0.006t^2 \quad \text{Ec. (10)}$$

Dónde:

ÁcG: Ácidos grasos (mg/L)

C_{O₃}: Concentración de ozono gas a la entrada (mg/L)

t: Tiempo (min)

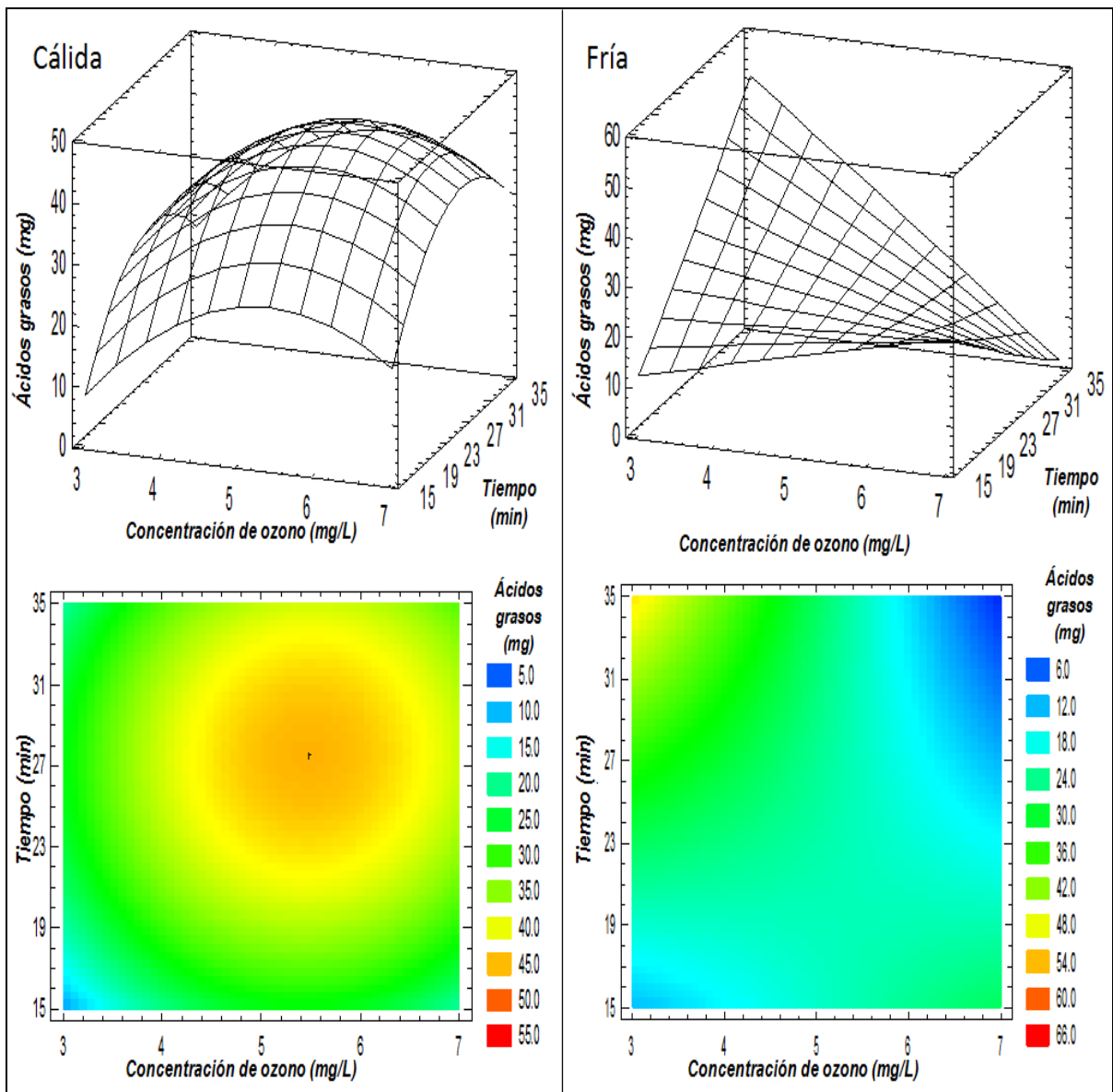


Figura 18 Superficies de respuesta obtenidas para los ácidos grasos extraídos (peso seco) en función del ozono.

Con la finalidad de analizar si existe una condición de DAO que satisfaga una adecuada recuperación de biomasa y al mismo tiempo permita una mayor extracción de ácidos grasos; los cuales podrían ser transformados mediante oxidación en aldehídos y compuestos de ácido carboxílico (Roshchina & Roshchina, 2003).

La condición óptima de operación a la cual se están recuperando la mayor cantidad de ácidos grasos se recurrió al modelo de superficie de respuesta. Para la época cálida se tiene una recuperación de 45.33 mgÁcG con una DAO de 33.78 mgO₃/L de agua y para la época fría 56 mgÁcG a una DAO de 20.89 mgO₃/L de agua.

Así como para los casos anteriores se realizó un balance de masa con los resultados obtenidos para saber la cantidad de ácidos grasos que se están recuperando por dosis aplicada de ozono. Se lograron obtener como máximo 1.32mgÁcG/mgO₃ para la época cálida y 2.14mgÁcG/mgO₃ para la época fría, con una DAO de 16.67mgO₃/L de agua y 23.33mgO₃/L de agua respectivamente. Así mismo se corrobora que las dosis altas ozono generan una baja recuperación de ácidos grasos (Tabla 11).

De igual forma la Tabla 11 muestra los mgÁcG*mgBS que se recuperaron por miligramo de ozono aplicado, se encuentra sombreado dentro de la tabla la DAO que obtuvieron 229.99mgÁcG*mgBS/mgO₃ con una DAO de 38.89mgO₃/L y para la época fría 343.67mgÁcG*mgBS/mgO₃ con 23.33mgO₃/L, es preciso mencionar que para la época fría la segunda mejor DAO a utilizar es de 38.89mgO₃/L.

Tabla 11 Análisis de ácidos grasos extraídos por efecto del ozono.

Temporada	DAO (mg/L)	Biomasa seca (mg)	mgBS/mgO ₃	ÁcG (mg)	mgÁcG/mgO ₃	mgÁcG/mgBS	(mgÁcG*mgBS)/mgO ₃
Cálida	10.00	52.63	5.26	9.00	0.90	0.171	47.37
	16.67	95.38	5.72	22.00	1.32	0.231	125.90
	23.33	146.77	6.29	25.00	1.07	0.170	157.25
	38.89	223.6	5.75	40.00	1.03	0.179	229.99
	54.44	337.53	6.20	30.00	0.55	0.089	185.99
Fría	10.00	143.99	14.40	12.00	1.20	0.083	172.79
	16.67	124.5	7.47	16.00	0.96	0.129	119.52
	23.33	160.38	6.87	50.00	2.14	0.312	343.67
	38.89	243.59	6.26	42.00	1.08	0.172	263.08
	54.44	416.07	7.64	2.00	0.04	0.005	15.28

Finalmente se realizó el análisis cromatográfico de los ácidos grasos extraídos obteniendo así el perfil del biodiesel de microalgas. De forma general el ácido palmítico (C16:0) y el linolénico (C18:3), son los ácidos extraídos que presentan mayor abundancia relativa en las muestras obtenidas de ambas épocas, de igual forma se lograron identificar en menor proporción ácido linoleico (C18:2), ácido palmitoleico (C16:1) y ácido esteárico (C18:0). La Figura 19 muestra el cromatograma obtenido para el consorcio de microalgas del lago Nabor Carrillo.

File :C:\msdchem\1\DATA\FAME40712-1.D
 Operator : MARIA TERESA VALERIANO
 Acquired : 4 Jul 2012 13:04 using AcqMethod FAME.M
 Instrument : MSD
 Sample Name: FAME`s TEXCOCO
 Misc Info : PRUEBA DE METODOLOGIA FAME
 Vial Number: 1

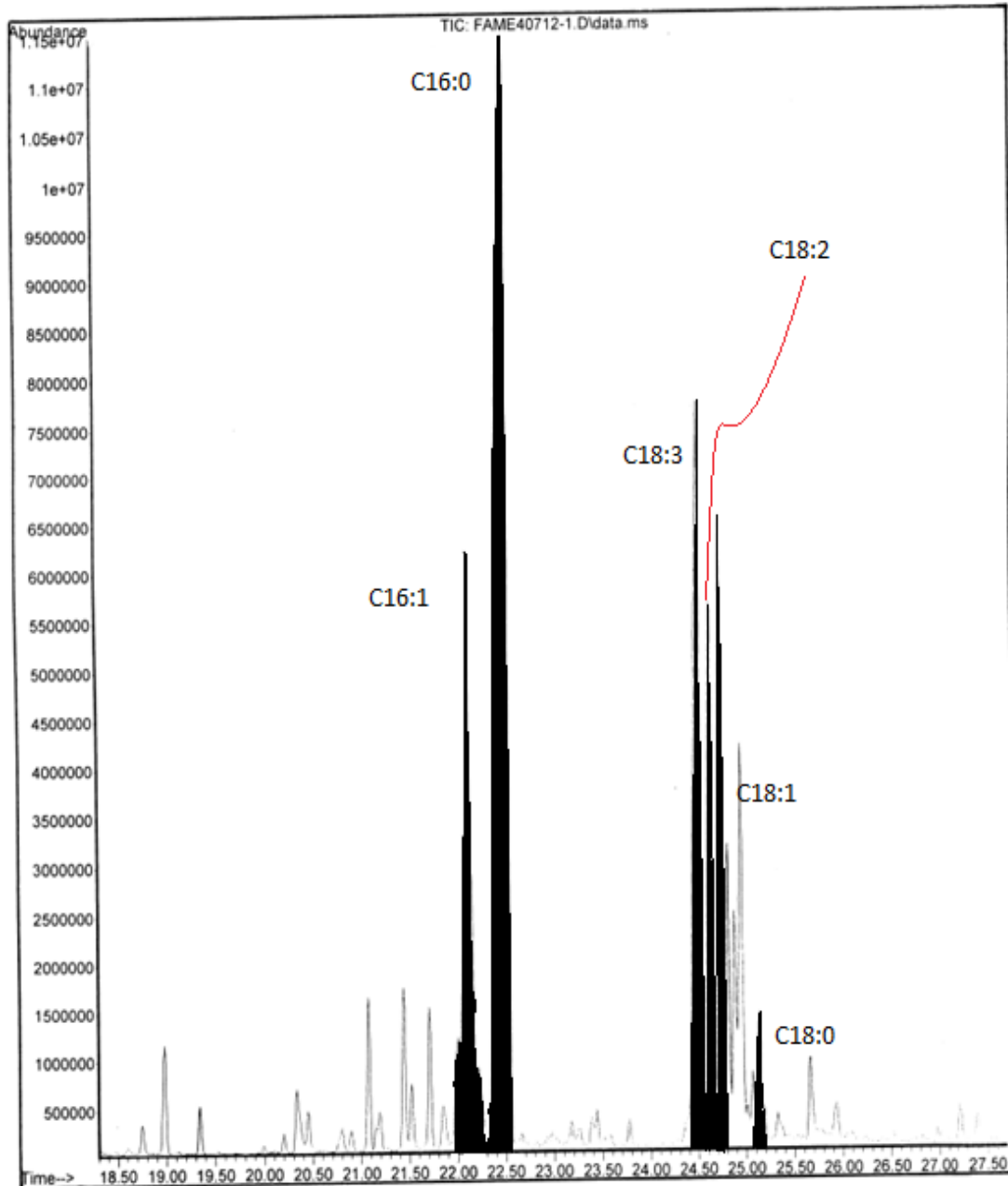


Figura 19 Cromatograma obtenido para el consorcio de microalgas del lago Nabor Carrillo

Como se puede observar en la Figura 20, con los resultados obtenidos no se puede establecer una tendencia de cambio en la abundancia relativa del perfil de ácidos grasos (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 y C18:3, Tabla 1), pero sí se concluye que el ozono está produciendo variaciones en el perfil de ácidos grasos con respecto al blanco.

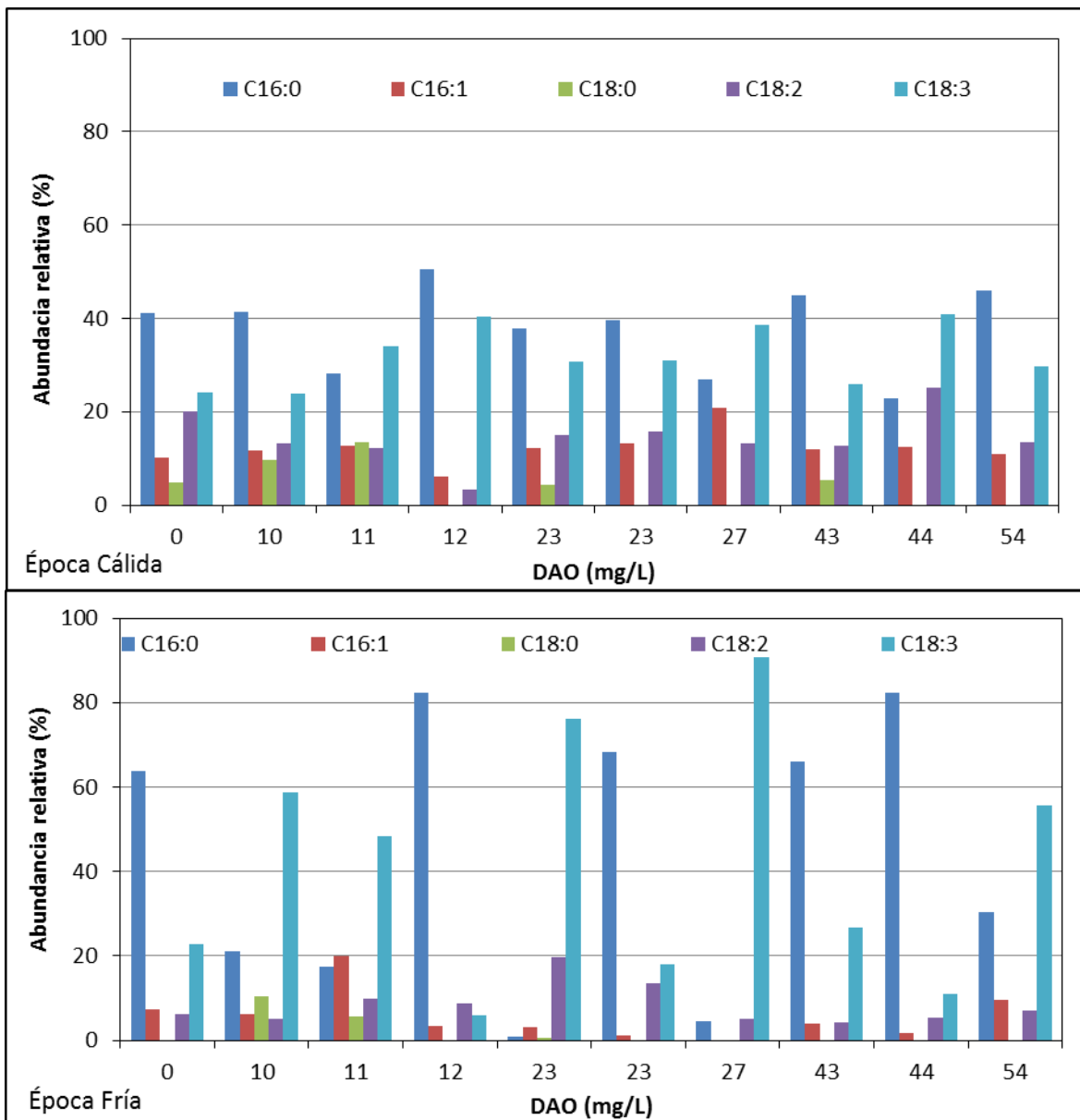


Figura 20 Abundancia relativa del perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos para ambas épocas se mantiene igual, mientras que la abundancia relativa de cada ácido graso muestra variaciones, esto se debe a la variación de especies de microalgas y a la concentración en la que están presentes en el lago Nabor Carrillo.

Conclusiones

- 1.El ozono genera la liberación de proteínas surfactantes y tiene un efecto de pre-tratamiento en la etapa extracción de ácidos grasos al provocar daño en la membrana celular de la microalga.
- 2.Se identificaron un total de 19 géneros de microalgas en el lago Nabor Carrillo, predominando los géneros *Anthrospira sp.*, *Ocellularia sp.* y *Spirulina sp.*, para ambas épocas del año (cálida y fría). Por su alto contenido de lípidos destaca la presencia de los géneros *Chlorella sp* (10-57% lípidos) y *Cyclotella sp* (42% lípidos), sin embargo, se observó que *Desmodesmus sp* (20% lípidos) presenta en una gran afinidad a reproducirse en agua residual, por lo tanto la convierte una candidata para la producción de biodiesel a partir de agua residual.
- 3.Durante la ozoflotación de microalgas el ozono induce la liberación de proteína intracelular y la formación de espuma que contribuyen a la separación de la biomasa algal, sin embargo en el consorcio estudiado con diferentes especies de microalgas, no se estableció una relación directa entre la proteína liberada y la cantidad de biomasa recuperada.
- 4.Se encontró que existe una relación directamente proporcional, entre la dosis aplicada de ozono (DAO) y la recuperación de la biomasa, es decir, un incremento en la DAO genera un incremento en la recuperación de la biomasa; una dosis aplicada de ozono del orden de 50 mgO₃/L genera una recuperación del 100% de la biomasa presente en muestras de agua del lago Nabor Carrillo.
- 5.El efecto de pre-tratamiento del ozono sobre la biomasa cosechada por ozoflotación incrementa la eficiencia de extracción de los ácidos grasos y modifica la abundancia relativa del perfil de ácidos grasos.

Trabajos futuros a desarrollar

- ✓ Producción de biodiesel a partir de géneros aislados de microalgas de un alto contenido de lípidos y capaces de ser cultivados en biorreactores que utilicen como medio de cultivo agua residual. Los géneros recomendados son *Chlorella sp*, *Cyclotella sp* y *Desmodesmus sp* por su alto contenido de lípidos y facilidad para reproducirse en agua residual.
- ✓ Evaluación de la calidad del biodiesel de microalgas, debido a la composición del perfil de ácidos grasos, ya que los estándares de calidad de biodiesel exigen bajas concentraciones de ácidos grasos insaturados.
- ✓ Estudios del proceso de ozoflotación, como son: mejoras en el diseño del reactor de flotación y establecer condiciones óptimas de cosecha de microalgas.
- ✓ Evaluación de los subproductos que se generan al utilizar un agua residual como medio de cultivo de las microalgas, durante el proceso de ozoflotación.
- ✓ Evaluación del efecto del ozono en la composición de las microalgas.

Referencias

1. Abou-Shanab, Reda A.I, Ibrahim A Matter, Su-Nam Kim, You-Kwan Oh, Jaeyoung Choi, and Byong-Hun Jeon. "Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater." *Biomass and Bioenergy*, 2011: 3079-3085.
2. AFDC. Alternative fuels and advanced vehicles data center. 2011. www.afdc.energy.gov/afdc/ (accessed Noviembre 26, 2011).
3. Ahmad, A.L, Mat Yasin, C.J.C Dereck, and J.K. Lim. "Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (2011): 584-593.
4. Amaro, Helena, Catarina Guedes, and Xavier Malcata. "Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel." *Applied Energy*, 2011: 3402-3410.
5. APHA; AWWA; WPCF. "Método colorimétrico de índigo." In *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*, by APHA, AWWA and WPCF. Madrid, España: Diaz de Santos, 1992.
6. APHA-AWWA-WPCF. "Algas, Laminas en color." In *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*, 10159-10210. Madrid, España: Diaz de Santos, 1992.
7. Becker, E.W. "Micro-algae as a source of protein." *Biotechnology Advances* 25 (2007): 207-210.
8. Borges, Lucelia, Joaquin A Morón-Villarreyes, Marcelo G Montes D'Oca, and Paulo Cesar Abreu. "Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*." *Biomass and bioenergy*, 2011: 4449-4454.
9. Bozbas, Kahraman. "Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union." *Renewable and Sustainable Energy* 12 (2008): 542-552.
10. Brennan, Liam, and Philip Owende. "Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010: 557-577.
11. Brennan, Liam, and Philip Owende. "Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010: 557-577.
12. Brown, Malcolm, and S.W. Jeffrey. "The amino acid and gross composition of marine diatoms potentially useful for mariculture." *Applied Phycology* 7 (1995): 521-527.
13. Cataldo, Franco. "On the action of ozone on proteins." *Polymer degradation and stability* , 2003: 105-114.
14. CEPAL. *Dialogo de políticas sobre desarrollo institucional e innovación en biocombustibles en América Latina y el Caribe*. 2010.

15. Cheng, Chen-Hsi, Tz-Bang Du, Hsien-Chueh Pi, Shyue-Ming Jang, Yun-Huin Lin, and Hom-Ti Lee. "Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂." *Bioresource Technology*, 2011: 10151-10153.
16. Cheng, Ya-Ling, et al. "Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*." *Bioresource Technology* 101 (2010): 9092-9096.
17. Cheng, Ya-Ling, et al. "Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation." *Bioresource Technology* 102 (2011): 82-87.
18. Chisti, Yusuf. "Biodiesel from microalgae." *Biotechnology Advances*, 2007: 294-306.
19. Chisti, Yusuf, and Jinyue Yon. "Energy from algae: Current status and future trends algal biofuels- A status report." *Applied Energy* 88 (2011): 3277-3279.
20. Chisti, Yusuf, and Murray Moo-Young. "Disruption of microbial cells for intracellular products." *Enzyme Microb Technol*, 1986: 194-204.
21. Cho, Sunja, et al. "Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources." *Bioresource technology*, 2013: 1-32.
22. Cho, Sunja, Thanh Thao Luong, Dukhaeng Lee, You-Kwan Oh, and Taeho Lee. "Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production." *Bioresource Technology* , 2011: 8639-8645.
23. Christenson, Logan, and Ronald Sims. "Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts." *Biotechnology advances*, no. 29 (2011): 686-702.
24. Demirbas, M. Fatih. "Biofuels from algae for sustainable development." *Applied energy* , 2011: 3473-3480.
25. Dunstan, G.A, J.K Volkman, S.W Jeffrey, and S.M. Barrett. "Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae." *Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1992: 115-134.
26. EBB. European Biodiesel Board. 2011. www.ebb-eu.org/ (accessed November 26, 2011).
27. Ehimen, E.A, Z.F Sun, and C.G. Carrington. "Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids." *Fuel*, 2010: 677-684.
28. FAO. *Algae-based biofuels: A review of challenges and opportunities for developing countries*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009.
29. Fazal, M.A, A.S.M.A Haseeb, and H.H. Masjuki. "Biodiesel feasibility study: An evaluation of material compatibility; performance; emission and engine durability." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011: 1314-1324.
30. Godos, de Ignacio, Saúl Blanco, Pedro A. García-Encina, Eloy Becares, and Raul Muñoz. "Long-term operation og high rate algal ponds for the biorremediation of piggery wastewater at high loading rates." *Bioresource Technology*, 2009: 4332-4339.
31. Granados, Yolanda Pica, Alicia Ronco, and Consuelo Báez Diaz. "Ensayo de toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Método de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro Neubauer." In *Ensayos toxicológicos y métodos de*

- evaluación de calidad de agua. Estandarización, intercalibración resultados y aplicaciones., by Gabriela Morales Castillo. México: Centro internacional de investigaciones para el desarrollo, 2004.
32. Halim Ronald, Brenda Gladman, Michael Danquah, and Paul Webley. "Oil extraction from microalgae for biodiesel production." *Bioresource Technology*, 2011: 178-185.
 33. Halim Ronald, Michael Danquah, and Paul Webley. "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review." *Biotechnology Advances* 30 (2012): 709-732.
 34. Halim Ronald, Razif Harun, Michael Danquah, and Paul Webley. "Microalgal cell disruption for biofuel development." *Applied Energy* 91 (2012): 116-121.
 35. Harun Razif, Manjinder Singh, Gareth Forde, and Michael Danquah. "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010: 1037-1047.
 36. Hoekman, S. Kent, Amber Broch, Curtis Robbins, Eric Cenicerros, and Mani Natarajan. "Review of biodiesel composition, properties and specifications." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011: 143-169.
 37. Hu Qiang, "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances." *The plant journal*, 2008: 621-639.
 38. Huang, GuanHua, Feng Chen, Dong Wei, XueWu Zhang, and Gu Chen. "Biodiesel production by microalgal biotechnology." *Applied Energy*, 2010: 38-46.
 39. IEA. Key world energy statistics. Paris : SOREGRAPH, 2012.
 40. IEA. World Energy Outlook. Francia: SOREGRAPH, 2010.
 41. IICA. Atlas de la agroenergía y los biocombustibles en las Américas: II Biodiesel. San Jose, C.R.: Programa hemisférico en agroenergía y biocombustibles, 2010.
 42. Jeng Jen-Chen, Hsuan-Hsien Yeh, and I-Cheng Tseng. "Effect of ozone and permanganate on algae coagulation removal-Pilot and bench scale tests." *Chemosphere* 74 (2008): 840-846.
 43. Kim Jungmin, "Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae." *Biotechnology Advances*, 2013.
 44. Kirrolia Anita, Narsi Bishnoi, and Rajesh Singh. "Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research and development aspects." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013: 642-656.
 45. Knothe, Gerhard. ""Designer" Biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties." *Energy and fuels*, 2008: 1358-1364.
 46. Knothe, Gerhard. "Biodiesel and renewable diesel: A comparison." *Progress in Energy and Combustion Science* , 2009: 364-373.
 47. Kramárová, Zuzana, Agáta Fargasová, Marianna Molnárová, and Marek Bujdos. "Arsenic and selenium interactive effect on alga *Desmodesmus quadricauda*." *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012: 1-6.

48. Langlais Bruno, David Reckhow, and Deborah Brink. Ozone in water treatment: Application and engineering. Francia: AWWA research foundation, 1991.
49. Lee Andrew K, David M Lewis, and Peter J. Ashman. "Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements." Biomass and bioenergy, 2012: 89-101.
50. Lee Jae-Yon, Chan Yoo, So-Young Jung, Chi-Young Ahn, and Hee-Mock Oh. "Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae." Bioresource Technology, 2010: 575-577.
51. Loera-Quezada, Maribel, and Eugenia Olguin. "Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades." Biotecnol Amb Algal, 2010: 91-116.
52. Maciel, Carlos Álvarez. "Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional." Economía Informa, 2009: 63-89.
53. Markou, Giorgos, and Dimitris Georgakakis. "Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review." Applied Energy, 2011: 3389-3401.
54. Mata, Teresa M, António A Martins, and Nidia S. Caetano. "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review." Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010: 217-232.
55. Medina, A. Robles, E. Molina Grima, A. Giménez Giménez, and M.J. González Ibáñez. "Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids." Biotechnology Advances, 1998: 517-580.
56. Mendes, Rui, Alberto Reis, and António Palavra. "Supercritical CO2 extraction of linolenic acid and other lipids from Arthrospira (Spirulina) maxima: Comparison with organic solvent extraction." Food Chemistry, 2006: 57-63.
57. Miao, Hengfeng, and Wenyi Tao. "The mechanisms of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal." Separation and purification technology, 2009: 187-193.
58. Montes, D'Oca Marcelo, et al. "Production of FAME from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of Chlorella pyrenoidosa." Biomass and Bioenergy, 2011: 1533-1538.
59. Muciño, Daniel. "Estudio general del Lago de Texcoco, México." Proyecto regional, Sistemas integrados de tratamiento y uso de aguas residuales en america latina: Realidad y Potencial. México, 2002.
60. Murugesan, A, C Umarani, R Subramanian, and N. Nedunchezian. "Biodiesel as an alternative fuel for diesel engines-A review." Renewable and sustainable energy reviews, 2009: 653-662.
61. Orta de Velasquez, M.T., I. Monje-Ramirez, and I. Yañez Noguez. "Saline landfill leachate disposal in facultative lagoons for wastewater treatment." Environmental Technology, 2012: 247-255.
62. Pan, Yi.Ying, Suz-Ting Wang, Lu-te Chuang, Yen-Wei Chang, and Ching-Nen Nathan Chen. "Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is

- predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*." *Bioresource Technology*, 2011: 10510-10517.
63. Pittman, Jon K, Andrew P Dean, and Olumayowa Osundeko. "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources." *Bioresource Technology*, 2010: 17-25.
 64. PND. Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012. México: Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos, 2007.
 65. Raouf-Abdel, N, A.A Al-Homaidan, and I.B.M. Ibraheem. "Microalgae and wastewater treatment." *Saudi Journal of Biological Sciences* , 2012: 257-275.
 66. Rawat, I, Ranjith R Kumar, T Mutabda, and F. Bux. "Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production." *Applied Energy*, 2011: 3411-3424.
 67. Rosch, Christine, Johannes Skarka, and Nadja Wegerer. "Materials flow modeling of nutrient recycling in biodiesel production from microalgae." *Bioresource Technology*, 2012: 191-199.
 68. Roshchina, Victoria, and Valentina Roshchina. *Ozone and plant cell*. Rusia: Springer-Science+Business Media, B.V., 2003.
 69. Sharma, Y.C, B Singh, and S.N. Upadhyay. "Advancements in development and characterization of biodiesel: A review." *Fuel*, 2008: 2355-2373.
 70. Singh, Bhawna, Anders Stromman, and Edgar Hertwich. "Scenarios for the environmental impact of fossil fuel power: Co-benefits and trade-offs of carbon capture and storage." *Energy*, 2012: 1-9.
 71. Spolaore, Pauline, Claire Joannis-Cassan, Elie Duran, and Arsène Isambert. "Commercial applications of microalgae." *The Society for Biotechnology*, 2006: 87-96.
 72. Sydney, E.B, et al. "Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage." *Applied energy*, 2011: 3291-3294.
 73. Uzun, Hicran, Esra Ibanoglu, Hatice Catal, and Senol Ibanoglu. "Effects of ozone on functional properties of proteins." *Food Chemistry*, 2012: 647-654.
 74. Velasquez-Orta, S.B, J.G.M Lee, and A. Harvey. "Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*." *Fuel*, 2012: 544-550.
 75. Vonshak, Avigad, and Amos Richmond. "Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An Overview." *Biomass*, 1988: 233-247.
 76. Wade, L.G. *Química Orgánica*, Quinta edición. Madrid, España: Pearson Educación, 2004.
 77. Wahlen, Bradley, Robert Willis, and Lance Seefeldt. "Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures." *Bioresource Technology*, 2011: 2724-2730.
 78. Williams, Peter, and Lieve Laurens. "Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: Review and analysis of the biochemistry, energetics and economics." *Energy and Environmental Science (Energy and Environmental Science)* 3 (2010): 554-590.

79. Yang, Jia, Ming Xu, Xuezhi Zhang, Qiang Hu, Milton Sommerfeld, and Yongsheng Chen. "Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance." *Bioresource Technology*, 2011: 159-165.
80. Yusuf, N.N.A.N, S.K Kamarudin, and Z. Yaakub. "Overview on the current trends in biodiesel production." *Energy conversion and management*, 2011: 2741-2751.
81. ZHU, Junying, Junfeng RONG, and Baoning ZONG. "Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel." *Chinese Journal of Catalysis* , 2013: 80-100.

Anexo 1-Análisis estadístico

Tabla 12 Análisis de varianza de la liberación de proteína total por efecto del aire y el ozono

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
Entre grupos	33030.1704	1	33030.1704	4.361534	0.0555078
Dentro de los grupos	106022.856	14	7573.06113		
Total	139053.026	15			

Tabla 13 Análisis de varianza para la recuperación de la biomasa

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
Entre grupos	286.86736	1	286.86736	0.333302	0.57960
Dentro de los grupos	6885.4502	8	860.681275		
Total	7172.31756	9			

Análisis estadístico: Proteína total liberada

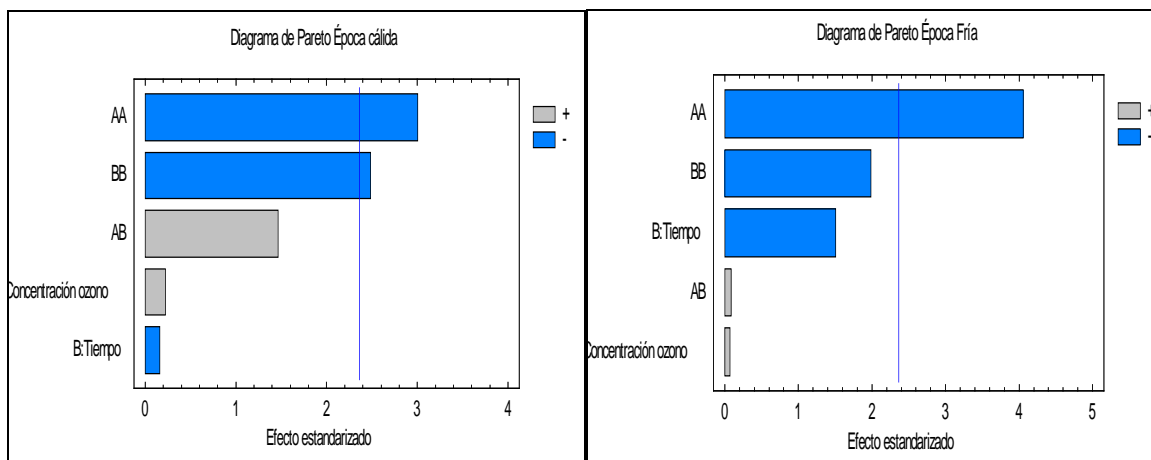


Figura 21 Análisis estadístico para la liberación de proteína total

Tabla 14 Condiciones del modelo de superficie obtenidas para la máxima liberación de proteína total

Condiciones de operación	Época cálida	Época fría
Concentración de ozono (entrada) (mg/L)	5.05	5.00
Tiempo de operación (min)	24.81	21.78
Concentración de proteína total estimada (mg/L)	358.55	607.73

Análisis estadístico: Recuperación de Biomasa seca

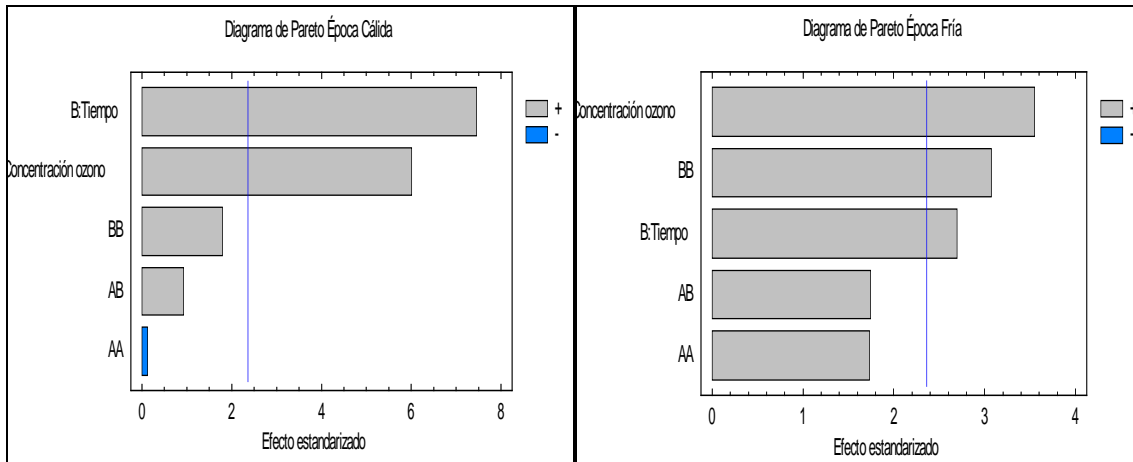


Figura 22 Análisis estadístico para la recuperación de Biomasa seca

Tabla 15 Condiciones del modelo de superficie obtenidas para la máxima recuperación de biomasa seca

Condiciones de operación	Época cálida	Época fría
Concentración de ozono (entrada) (mg/L)	7.53	7.53
Tiempo de operación (min)	37.61	37.61
Recuperación de biomasa seca estimada (mg/L)	468.86	560.19

Análisis estadístico: Recuperación de ácidos grasos

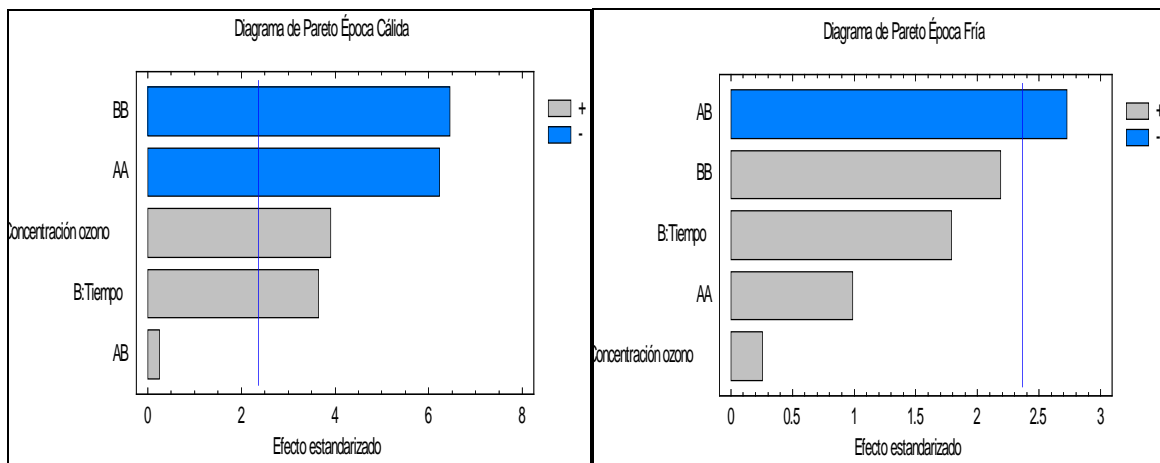


Figura 23 Análisis estadístico para la recuperación de ácidos grasos presentes en microalgas

Tabla 16 Condiciones del modelo de superficie obtenidas para la máxima recuperación de ácidos grasos

Condiciones de operación	Época cálida	Época fría
Concentración de ozono (entrada) (mg/L)	5.54	2.46
Tiempo de operación (min)	27.44	37.61
Recuperación de ácidos grasos estimado (mg/gBS)	45.33	56