



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

**OBTENCIÓN DE UN BIOPLÁSTICO A PARTIR DE BIOMASA DE UN
CONSORCIO MICROALGAL CULTIVADO EN AGUA RESIDUAL.**

TESIS

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

PRESENTA:

Q.F.B. CÉSAR JAVIER LÓPEZ ROCHA

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR:

DRA. MIRNA ROSA ESTRADA YÁÑEZ, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
MATERIALES

DR. IGNACIO MONJE RAMÍREZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

CIUDAD DE MÉXICO, octubre de 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Alejandro Vargas Casillas

Secretario: Dr. Armando González Sánchez

1er Vocal: Dr. Ignacio Moje Ramírez

2do Vocal: Dra. Mirna Rosa Estrada Yáñez

3er Vocal: Dra. María Teresa Orta Ledesma

Lugares donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

Laboratorio de Reología, Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España.

TUTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA

FIRMA



El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015 No. de Certificado: CMX C SGC 155 2017, válido en el período del 09 de noviembre de 2017 al 09 de noviembre de 2020

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1. CAPÍTULO 1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS	10
2.1.1. Linaje verde, Microalgas clorófitas.	10
2.1.2. Composición bioquímica de las microalgas de agua dulce	13
2.1.3. Aplicaciones en el tratamiento de aguas	15
2.1.4. Parámetros para el cultivo de microalgas en agua residual	16
2.1.4.1. Luz disponible para el desarrollo microalgal	18
2.1.4.2. Temperatura ideal	18
2.1.4.3. pH óptimo	19
2.1.4.4. Macronutrientes esenciales para el ciclo de vida microalgal	19
2.2. CAPÍTULO 2 BIOPOLÍMEROS	21
2.2.1. Materiales con base biológica	21
2.2.2. Plastificantes	22
2.2.3. Bioplásticos y clasificación	24
2.2.4. Bioplásticos derivados de microalgas	27
2.3. CAPÍTULO 3 PROPIEDADES DE LOS MATERIALES Y PRUEBAS DE RESISTENCIA	31
2.3.1. Propiedades de los materiales poliméricos y reología.	31
2.3.2. Comportamiento elástico y viscoso	33
2.3.3. Ensayos mecánicos	34
2.3.3.1. Ensayo de tracción y torsión	35
2.3.3.2. Moldeo por compresión	36
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVO GENERAL	38
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
5. METODOLOGÍA	39
5.1. Obtención de la Biomasa Cultivada en Agua Residual Tratada	40
5.1.1. Muestreo y Caracterización del agua de cultivo y Remoción de nutrientes del consorcio	40

5.1.2. Cultivo del consorcio microalgal en agua residual tratada	42
5.1.3. Cosechado, secado y pulverizado de la Biomasa Microalgal	45
5.2. Obtención del Bioplástico	46
5.2.1. MATERIALES	46
5.2.2. EQUIPOS	47
5.3. Mezclado de las materias primas	48
5.4. Caracterización reológica de las mezclas	49
5.5. Moldeo por Inyección	50
5.6. Caracterización Reológica del Bioplástico	51
5.7. Capacidad de absorción de agua	52
5.8. Análisis termomecánico	53
5.9. Análisis estadístico	53
6. RESULTADOS	54
6.1. Curvas de crecimiento de la biomasa y remoción de nutrientes del agua residual	54
6.2. Cultivo de la biomasa, crecimiento de las microalgas	56
6.3. Identificación de los principales géneros del consorcio	57
6.4. Microanálisis de la biomasa microalgal	62
6.5. Evolución del torque y la temperatura durante el mezclado de las materias primas	63
6.6. Barrido de temperatura de las masas obtenidas	66
6.7. Inyección de las muestras	68
6.8. Tracción hasta rotura del bioplástico	69
6.9. Rampa de temperatura del bioplástico (Torsión)	72
6.10. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble	74
6.11. Análisis termomecánico	75
7. CONCLUSIONES	78
8. REFERENCIAS	79
9. AGRADECIMIENTOS	87

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Composición bioquímica de los microorganismos de interés industrial	13
Tabla 2. Perfil de aminoácidos presentes en diferentes fuentes de biomasa	14
Tabla 3. Compilación de diferentes publicaciones donde se obtienen materiales poliméricos a partir de fuentes de biomasa microalgal.	30
Tabla 4. Métodos utilizados para determinar las propiedades fisicoquímicas del cultivo	41
Tabla 5. Resultado de microanálisis de biomasa microalgal	55
Tabla 6. Comparativo de los valores de módulo de Young y absorción de agua	77
Figura 1. Descripción general de la filogenia del linaje verde	11
Figura 2. Esquema de producción de microalgas	17
Figura 3. Crecimiento del consorcio microalgal en agua residual tratada	43
Figura 4. Crecimiento del consorcio en biorreactores de PET	44
Figura 5. Cosecha y procesado de la biomasa del consorcio microalgal	45
Figura 6. Biomasa seca y pulverizada recuperada del cultivo en agua residual	46
Figura 7. Suplemento alimenticio comercial de <i>Arthrospira máxima</i>	47
Figura 8. Reómetro mezclador en funcionamiento	48
Figura 9. Sensores tipo prensa en el reómetro para la caracterización reológica de la mezcla	49
Figura 10. Inyectora de escala laboratorio tipo pistón	50
Figura 11. Molde con medidas estandarizadas	50
Figura 12. Reómetro de esfuerzo controlado RSA3	51
Figura 13. Reómetro híbrido de deformación DHR-3	51
Figura 14. Prueba de absorción de agua	52
Figura 15. Prueba de sólidos suspendidos totales	54
Figura 16. Gráfica de la curva de crecimiento y remoción de nutrientes del consorcio microalgal	55
Figura 17. Crecimiento de las microalgas en agua residual tratada	56
Figura 18. Microalga <i>Scenedesmus sp</i>	58
Figura 19. Microalga <i>Desmodesmus sp</i>	59
Figura 20. Consorcio microalgal cultivado en agua residual	60
Figura 21. Diferentes especies de <i>Scenedesmus</i>	61
Figura 22. Mezclador con rodillos giratorios	63
Figura 23. Gráficas del mezclado de las materias primas	65
Figura 24. Gráficas del. Barrido de temperatura de las mezclas	67
Figura 25. Probetas obtenidas del moldeo por inyección	68
Figura 26. Gráficas de tracción hasta rotura para los bioplásticos obtenidos de la biomasa comercial	70
Figura 27. Gráficas de tracción hasta rotura para los bioplásticos obtenidos de la biomasa cosechada del agua residual tratada	71
Figura 28. Gráficas de torsión de los bioplásticos	73
Figura 29. Resultados de la pérdida de material soluble y la absorción de agua en las probetas.	74
Figura 30 Gráfico del. análisis termomecánico del bioplástico de microalgas cultivadas en agua residual.	75

RESUMEN:

Este proyecto se centra en el desarrollo de un nuevo material bioplástico utilizando como materia prima principal la biomasa de microalgas combinadas con un plastificante (glicerol) y procesadas mediante inyección en molde. El proceso de obtención se dividió en dos etapas; la primera fue el cultivo de un consorcio de microalgas (*Scenedesmus* sp y *Desmodesmus* sp como especies predominantes) utilizando el agua residual tratada, rica en nitrógeno (N) y fósforo (P), proveniente del último efluente de una planta de tratamiento de agua residual. El consorcio logró metabolizar los iones de N y P presentes como nitratos y ortofosfatos en un 98.9% y 83%, respectivamente. Una vez que el consorcio alcanzó un total de 500 mg/L de sólidos suspendidos totales, se separaron del agua mediante centrifugación y se secaron a 35°C para obtener un pulverizado fino. La segunda etapa fue el mezclado de las materias primas, seguida de un moldeo por inyección con compresión del material a determinada temperatura. Se utilizó como referencia un producto comercializado como suplemento alimenticio de biomasa de *Arthrospira máxima* para la comparación de los resultados obtenidos, dicha biomasa se mezcló con las mismas proporciones de plastificante. La relación de biomasa/plastificante que mostró las mejores características para inyectar en el molde fue de 60/40 %wt para ambas mezclas.

Después de inyectar a tres temperaturas de molde diferentes (100°C, 120°C y 140°C) los bioplásticos obtenidos de ambas mezclas se sometieron a ensayos reológicos de tracción, torsión, análisis termomecánico, análisis termogravimétrico y se evaluó la capacidad de absorción de agua. Las pruebas demostraron que la temperatura del moldeo ejerce un efecto notable en la viscoelasticidad del material, siendo la temperatura de 120°C la que obtuvo los mejores resultados. Para la prueba de absorción de agua, todas las temperaturas de moldeo mostraron un hinchamiento de más del doble del peso inicial de las probetas, sin embargo, las que obtuvieron valores más altos fueron las moldeadas a 140°C.

Al comparar las características del bioplástico de microalgas con otros materiales que han sido procesados de igual manera, pero con diferente fuente de biomasa (soja, pectina, entre otras especies de microalgas), así como la adición de plastificantes derivados del petróleo observamos que las propiedades de éste nuevo biomaterial presentan características de resistencia menores a los materiales previamente desarrollados, ya que dependen de la naturaleza de la biomasa, del plastificante utilizado y del aditivo pétreo añadido, sin embargo, este material podría utilizarse en aplicaciones industriales donde se requiera una retención de agua, como por ejemplo en la elaboración de charolas germinadoras de semillas. Así mismo, si se perfecciona su fabricación con la adición de otros compuestos, se podría desarrollar un biomaterial más resistente que pueda competir con los plásticos convencionales que se siguen produciendo en el mundo.

ABSTRACT:

This project focuses on the development of a new bioplastic material using as main raw material the biomass of microalgae combined with a plasticizer (glycerol) and processed by injection moulding. The process was divided into two stages; the first was the cultivation of a consortium of microalgae (*Scenedesmus* and *Desmodesmus* as predominant species) using treated wastewater, rich in nitrogen (N) and phosphorus (P), from the last effluent of a wastewater treatment plant. The consortium managed to metabolize the N and P ions present as nitrates and orthophosphates in 98.9% and 83%, respectively. Once the consortium reached a total of 500 mg / L of total suspended solids, they were separated from the water by centrifugation and dried at 35 ° C to obtain a fine dust. The second stage was the mixing of the raw materials, followed by injection moulding with compression at a certain temperature. A product marketed as a nutritional supplement of *Arthrospira maximum* biomass was used as a reference for the comparison of the results obtained, this biomass was mixed with the same proportions of plasticizer. The biomass / plasticizer ratio that showed the best characteristics to inject into the mold was 60/40% wt for both mixtures.

After injecting at three different mold temperatures (100 ° C, 120 ° C and 140 ° C) the bioplastics obtained from both mixtures were subjected to rheological tests of traction, torsion, thermomechanical analysis, thermogravimetric analysis and the absorption capacity was evaluated of water. The tests showed that the temperature of the molding exerts a notable effect on the viscoelasticity of the material, with the temperature of 120 ° C being the one that obtained the best results. For the water absorption test, all molding temperatures showed a swelling of more than double the initial weight of the specimens, however, those that obtained higher values were those molded at 140 ° C.

When comparing the characteristics of the bioplastic of microalgae with other materials that have been processed in the same way, but with different sources of biomass (soy, pectin, among other species of microalgae), as well as the addition of plasticizers derived from petroleum, we observe that the properties of this new biomaterial have lower resistance characteristics to previously developed materials, since they depend on the nature of the biomass, the plasticizer used and the added stone additive, however, this material could be used in industrial applications where a retention of water, such as in the preparation of seed germination trays. Likewise, if its manufacturing is perfected with the addition of other compounds, a more resistant biomaterial could be developed that can compete with the conventional plastics that are still produced in the world.

1. INTRODUCCIÓN:

Hoy en día se sabe que los productos derivados de los combustibles fósiles son altamente contaminantes para el medio ambiente debido a su baja biodegradabilidad. La humanidad se ha encontrado con el reto de implementar nuevas fuentes de obtención de los materiales que se usan en la vida cotidiana, tal es el caso de los polímeros derivados del petróleo, a los cuales se les han dado múltiples usos como fibras para crear ropa, películas para proteger alimentos, bolsas y envases, aunque también existen excipientes en cosméticos, fertilizantes e incluso en fármacos que provienen de la refinería del petróleo. Sin embargo, este uso desmedido ha llevado a que el ecosistema se altere con atributos negativos que incluyen la recalcitrancia a la biodegradación, la toxicidad después de la incineración y la acumulación masiva de desechos en los vertederos y el medio ambiente marino, generando la muerte de diversas especies (Gall & Thompson, 2015). Cada año, más de 140 millones de toneladas de polímeros derivados del petróleo se producen en todo el mundo y se utilizan en la producción de plásticos tales como polietileno, poliestireno, cloruro de polivinilo, poliuretano y otros. Sobre todo, usando petróleo, carbón y gas natural como materias primas para su fabricación, estos plásticos son comunes en todas las facetas de nuestras vidas, siendo el uso doméstico donde se encuentran mayoritariamente, han sido vistos como una opción para sustituir otros materiales (como metales o madera) por las amplias propiedades que poseen: ligereza, resistencia, transparencia y un bajo costo de producción.

La obtención de los plásticos es llevada a cabo por un proceso llamado polimerización (Mart.n, 2012): una reacción química de síntesis en la que dos o más moléculas se combinan para formar otra en la que se repiten seguidamente nuevas estructuras moleculares dando lugar al polímero. Una vez que los compuestos poliméricos han sido creados, en forma de polvos, gránulos o pastas, se lleva a cabo el tratamiento de los plásticos a través de procedimientos como la extrusión, la inyección, o la compresión. Una vez que se ha realizado cualquiera de los procesos, se pasa a la fase de fabricación y utilización con el ensamblado. De igual manera, al mezclar dos o más tipos de plásticos (denominados "aditivos") modifican las propiedades del material otorgándole mayor resistencia, o para protegerlo de la radiación ultravioleta, mientras otros se utilizan como colorantes, retardantes de flama y plastificantes. Estas y otras características son lo que hace que tengan una infinidad de aplicaciones en diversos sectores industriales, desde el uso de marcapasos y prótesis para el sector médico hasta el desarrollo de piezas a fabricación de aviones, barcos, cohetes, trenes, motocicletas, globos, automóviles, bicicletas, teléfonos, antenas parabólicas, cámaras. Así mismo, los plásticos han contribuido notablemente en la evolución de la denominada "Era de la Información" ya que el Internet, las redes de telecomunicaciones por satélite, cable, ordenadores personales, telefonía móvil, contienen plásticos en su diseño y

son necesarios para su correcto funcionamiento. Sin embargo, al ser desechados en el ambiente pueden permanecer durante muchos años, más que el tiempo de vida de animales que habitan en el planeta (DiGregorio, 2009). Por lo que en años recientes se han desarrollado alternativas biológicas a partir de microorganismos o fuentes vegetales, para tratar de reducir el impacto ambiental que tienen estos materiales al término de su vida útil.

La investigación para la producción de bioplásticos (polímeros provenientes de organismos de la flora, ej celulosa, o fauna, ej seda) comenzó en 1920 por el microbiólogo francés Maurice Lemoigne, descubrió el poli-3-hidroxibutirato (PHB) formado en los gránulos intracelulares de la bacteria gram-positiva *Bacillus megaterium*. Sin embargo no fue hasta la década de los 80's cuando comenzó un período de experimentación que condujo al descubrimiento de que ciertos aditivos de origen sintético pueden mejorar la calidad de dichos bioplásticos, estos aditivos modifican su composición y por tanto hacen que algunos bioplásticos no puedan degradarse tan rápido como se desearía por provenir de fuentes naturales y continúe dicho problema de permanencia en el ambiente durante un prolongado periodo de tiempo, aunado a que si no tienen los tratamientos industriales necesarios para su degradación, estos se rompen, dividen y convierten en pedazos cada vez más pequeños denominados "microplásticos" y estos a su vez pueden ser confundidos con el alimento de la fauna terrestre y marina pero al no poder ser digeridos por ellos se acumulan en sus organismos (bioacumulables) y al ser consumidos por otros seres vivos de la cadena trófica, también entran a su organismo, lo cual puede llegar a tener complicaciones muy nocivas para la fauna, incluyéndonos los humanos (Philp, Bartsev, Ritchie, Baucher, & Guy, 2013).

Actualmente existen estudios de ciertas especies de microorganismos genéticamente modificados que podrían ayudar a acelerar la descomposición de los plásticos derivados del petróleo de forma limitada (Keshavarz & Roy, 2010). Además, se hicieron más comunes las investigaciones de materiales con base biológica, como el ácido poliláctico (PLA), que proceden de la fermentación microbiana de sustratos naturales como el almidón y algunos aceites. El aspecto más significativo de los bioplásticos es que pueden fabricarse con recursos renovables (Luengo, García, Sandoval, Naharro, & Olivera, 2003). Actualmente se han utilizado proporciones de biomasa-almidón y celulosa de maíz, trigo, arroz, papa, entre otros, como material base para la conversión de bioplásticos, como el acetato de celulosa (CA) y el almidón termoplástico (TPS). Otro enfoque para formar plásticos de base biológica es utilizar biopolímeros de proteínas naturales que se han procesado termomecánicamente (Zeller, et. al, 2013). Muchos de estos plásticos a base de proteínas provienen de cultivos terrestres: semilla de soya y girasol. Las proteínas de la soya han sido ampliamente estudiadas y se han utilizado para fabricar películas bioplásticas y diversos productos de uso cotidiano desechable o reutilizable, como cubiertos, vasos, platos, entre otros (Gómez Martínez, 2013). La caseína, proteína de la leche también tiene una larga historia de uso en la fabricación de productos de uso común, ya que al combinarse con

formol mediante un proceso termoplástico se obtiene galatita o marfil artificial, que es un bioplástico rígido que puede utilizarse como charolas para alimentos, láminas para embalajes. De igual manera se pueden obtener fibras para producción textil y pinturas de base biológica a partir de la caseína (Kamiya, et. al, 2005).

Una de las principales limitaciones de los plásticos de base biológica es que la fuente de biomasa compite con aplicaciones alimenticias, y para poder producir esta biomasa se necesita de grandes cantidades de tierra fértil, así como el consumo de agua de riego, fertilizantes y otros productos derivados del petróleo (pesticidas) en su ciclo de vida. Además de que demoran mucho tiempo en crecer, y después se necesita de una cosecha para producir las grandes cantidades de biomasa requeridas para reemplazar en los mercados las materias primas plásticas convencionales y al mismo tiempo alimentar a la población con los mismos productos agrícolas (soya, maíz) (Lambert & Wagner, 2017).

Se ha identificado que la biomasa de origen microalgal es una alternativa para la obtención de bioplásticos. Estos pequeños organismos acuáticos están constituidos por un gran contenido proteínico. Por ejemplo, los géneros *Spirulina* y *Chlorella* tienen un porcentaje de proteína en peso seco del 46% a 63%, y de 51% a 58% respectivamente (Zeller et al., 2013). El cultivo de microalgas presenta ventajas en comparación con las plantas y las semillas, ya que éstas no necesitan tierra fértil para desarrollarse y permiten el uso de aguas no potables como medio de cultivo; así mismo, pueden duplicar su biomasa en períodos de tiempo muy cortos (horas), y presentan niveles superiores de fijación de CO₂ que otros organismos más complejos, como macroalgas y cocolitoforos (Abdel-Raouf, et. al, 2012). Sin embargo, la implementación y el desarrollo de estas tecnologías ha resultado costosa ya que se considera una disciplina relativamente nueva y aún existen muchos factores (como el método de cosecha) que hay que mejorar antes de implementar su uso a una escala industrial.

En las últimas décadas se ha propuesto el uso del agua residual como una manera de disminuir el costo de operación en la producción de biomasa microalgal, aunado a la remoción de nutrientes que necesitan las microalgas en su ciclo de vida como nitrógeno, fósforo y carbono del agua utilizada para su cultivo (Cho, et al., 2013a), sin embargo, el uso de agua residual no es suficiente para que este proceso sea costeable, ya que una de las etapas más caras de la obtención de biomasa es la cosecha, es decir, la remoción de las células microalgales (de tamaño de 3-300 µm) para su posterior valorización y la utilización de biomoléculas (lípidos, carbohidratos y proteínas) para la obtención de biodiesel, bioetanol y, como en el caso de este trabajo, la obtención de bioplásticos. Una de las estrategias para disminuir el costo de cosecha de las microalgas es emplear tratamientos que puedan realizar la mayor separación de estos organismos, siendo algunas de estas técnicas la coagulación-floculación, la centrifugación y la filtración por membranas (Abdel-Raouf, et.al, 2012). Y más

recientemente el uso de ozonoflotación con resultados prometedores (Valeriano González, Monje-Ramírez, Orta Ledesma, Gracia Fadrique, & Velásquez-Orta, 2016).

Se han llevado a cabo varios estudios para el aprovechamiento de la biomasa microalgal en la producción de hidrógeno y metano mediante digestión anaeróbica (Méndez & Monroy, 2009), así como la producción de bioetanol a partir del azúcar fermentable y su uso como biofertilizante (Razo, et. al, 2007), sin embargo, existen pocos estudios para utilizar la biomasa microalgal que se genera de un proceso de tratamiento de agua residual en la producción de materiales de alto valor agregado, como los bioplásticos hechos a base de proteínas (Martínez, et.al, 2013), siendo éstos una alternativa ecológica actual para disminuir la contaminación generada día a día por los plásticos convencionales, así mismo el cultivo de microalgas en agua residual, ayuda a disminuir el costo de producción de la biomasa (Cho et al., 2013;. Ji et al., 2015).

Los usos alternativos para el tratamiento de aguas residuales utilizando microalgas incluyen la remoción de metales pesados y algunos colorantes a través de bioadsorción, o bien, como una fuente de nutrientes en medios de cultivo fermentables (Beuckels, et al, 2015). Por otro lado en los últimos años ha incrementado el interés en el descubrimiento de alternativas sustentables, competitivas y biodegradables a los plásticos convencionales que se obtienen a base de petróleo, lo cual ha alentado el desarrollo de bioplásticos a base de proteínas (Bourtoom, 2009). Los polímeros derivados de proteínas muestran altas tasas de degradación, lo que significa que son candidatos prometedores para producir materiales biodegradables para la elaboración de objetos con usos funcionales de corto tiempo (desechables), como las bolsas, películas envolventes de alimentos artículos diversos, cosméticos, entre otros (Matveev, et al, 2000).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. CAPITULO 1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS

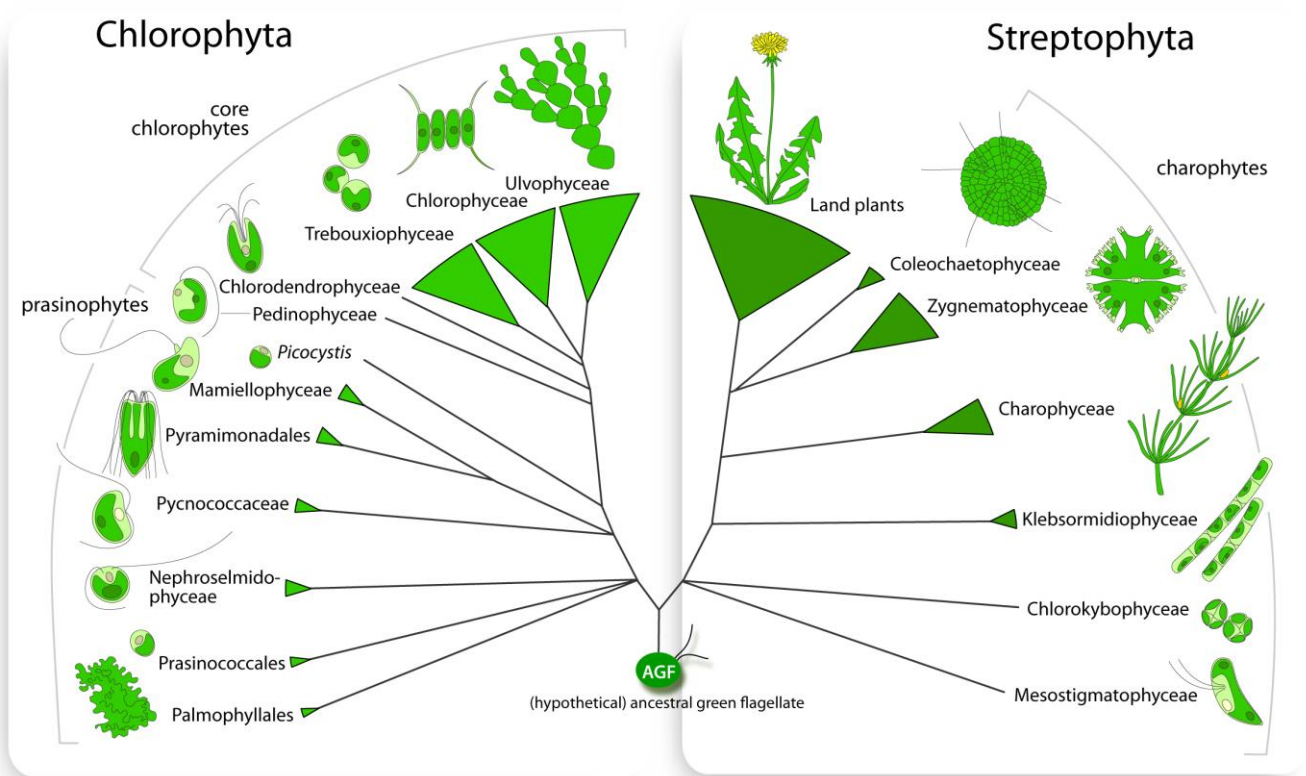
2.1.1 Linaje verde, microalgas clorófitas

Dentro del dominio *Eukaryota* nos encontramos con el subreino *Viridiplantae*, también conocido como “el linaje verde” ya que comprende las algas verdes y sus descendientes, las plantas terrestres, es decir, son seres vivos que sintetizan pigmentos de clorofila lo cual les permite obtener energía mediante mecanismos fotosintetizadores. El avance en los estudios filogenéticos evolutivos moleculares y la genómica comparativa han enriquecido enormemente la comprensión de las relaciones evolutivas del linaje verde (Leliaert et al., 2012). Las hipótesis actuales plantean que a partir de un microorganismo flagelado verde ancestral se originaron dos clados; el *Streptophyta*, que incluye las algas verdes carófitas de las que evolucionaron las plantas terrestres, y el clado *Chlorophyta*, que dieron lugar a los clorofitos centrales. La Figura 1 muestra un diagrama general de dicha clasificación.

Aproximadamente el 50% de la fotosíntesis que tiene lugar en la Tierra es llevada a cabo por las algas, gracias a que poseen pigmentos como la clorofila a, b y c, ficobilinas y carotenos. Son un grupo muy diverso de organismos y microorganismos fotoautótrofos predominantemente acuáticos y además capaces de asimilar carbono en forma de CO₂ actuando como uno de los mejores sistemas de captura de este gas.

Pueden encontrarse en diversos hábitats como suelo, rocas, pantanos, aguas termales, aguas dulces, marinas y salobres. En la actualidad, se ha estimado que existen de 200,000 a 800,000 especies, de los cuales unas 35,000 especies ya se han descrito en la literatura (Cheng et al., 2011). Se clasifican de acuerdo a su tipo de organización celular, a su morfología como tamaño y presencia de flagelos, o a los pigmentos que produce. Entre las divisiones taxonómicas tenemos algunas como: *Rhodophyta*, *Euglanophyta*, *Cyanophyta* y *Chlorophyta*, éstas últimas son conocidas como algas verdes debido a la presencia de cloroplastos en su paquete celular, y son las que nos resultan de mayor interés para la realización de este trabajo, debido a que diversas especies de microalgas de la división *Chlorophyta* y cianobacterias de la división *Cyanophyta* han sido estudiadas y cultivadas en aguas dulces desde épocas prehistóricas con la finalidad de producir biomasa con un alto contenido nutricional. Algunas de ellas engloban especies como:

Chlorella, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Scenedesmus*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium* (Olivares, 2010).



Modified from Leliaert et al., *Crit. Rev. Plant Sci.* 31:1-46 (2012) updated 25 Oct 2013

Figura 1. Descripción general de la filogenia del linaje verde

La mayor parte de las microalgas del género *Chlorophyceae*, se encuentran en hábitats marinos, sin embargo, existen algunas especies que se han adaptado a una amplia gama de entornos, por ejemplo, algunas se fijan a las rocas o a las cortezas de los árboles en donde la humedad atmosférica es elevada y les permite subsistir, incluso hay especies que se llegaron a combinar con hongos para formar líquenes. Algunas otras han desarrollado flagelos y tienen la ventaja de la motilidad, como es el caso de *Haematococcus pluvialis*.

Las microalgas que están suspendidas en agua, tienen un mejor acceso a los “nutrientes” disueltos en el medio, muchos de éstos resultan ser “contaminantes tóxicos” para los humanos, estos componentes pueden ser captados por la biomasa microalgal llevando así una eliminación o biotransformación del compuesto. Esta capacidad fitorremediadora puede utilizarse para generar sistemas de cultivo con 2 propósitos: la eliminación de contaminantes de aguas no potables y la producción de biomasa de alto contenido nutricional con fines comerciales (Umamaheswari et al, 2016).

En los últimos años se han logrado avances importantes en la utilización de las microalgas para diversos fines, sin embargo, las microalgas se han cultivado, cosechado y utilizado como suplemento alimenticio para consumo humano desde tiempos prehispánicos, por ejemplo, en México, los aztecas elaboraban un producto parecido a una tortilla, que llamaban “*techuitlatl*”, que significa “comida de barro”. Así mismo, en algunas regiones de África se colecta la *Spirulina* y la utilizan hasta la fecha para hacer un platillo llamado *Dihé* (Espinoza Escalante, 2017). Así mismo se les ha dado uso en cosmetología, en el tratamiento de aguas residuales, para la prevención de contaminación acuática, en la acuicultura, para la producción de pigmentos y antibióticos dentro de la industria farmacéutica, entre otros usos (Saha, et. al, 2015).

Cabe resaltar que no todas las microalgas son benéficas, ya que hay algunas especies oportunistas que pueden llegar a desarrollarse masivamente y a su vez producen toxinas, que tienden a concentrarse a lo largo de las cadenas tróficas, de modo que los peces que se alimentan de ellas suelen ser tóxicos para los humanos. Por ejemplo, *Microcystis aeruginosa* es una de estas especies y puede producir daños causando irritación en la piel, enfermedades citotóxicas e incluso cáncer de páncreas, tanto en animales como en humanos (Figueroa-Torres, et al, 2015)

2.1.2. Composición bioquímica de las microalgas de agua dulce:

En la literatura se han publicado múltiples análisis de la composición bioquímica completa de diferentes microalgas del género Clorófitas (Markou & Nerantzis, 2013). En general son tres las macromoléculas que forman parte de los constituyentes principales; carbohidratos, lípidos y proteínas. (Round, 1971)

Los datos seleccionados de varias especies de microalgas y bacterias que han sido utilizadas para la producción de distintos biocompuestos se compilan en la Tabla 1.

Especie	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)
<i>Anabaena cylindrica</i>	43 - 56	25 - 30	4 - 7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 - 58	12 - 17	14 - 22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39 - 61	14 - 18	14 - 20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28 - 39	40 - 57	9 - 14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 - 56	10 - 17	12 - 14
<i>Spirogyra</i> sp.	6 - 20	33 - 64	11 - 21
<i>Arthrospira maxima</i>	60 - 71	13 - 16	6 - 7
<i>Spirulina platensis</i>	46 - 63	8 - 14	4 - 9
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11

Tabla 1. Composición bioquímica de los microorganismos de interés industrial (Becker, Edward. & Kumar, 2015)

Aunque la biomasa microalgal presenta un enorme potencial para la producción de varios productos debido a su alto contenido de nutrientes y compuestos de interés, como pigmentos (Barka & Blecker, 2016), existen desafíos para lograr que la producción a gran escala sea viable, ya que se debe proporcionar un entorno físico y químico adecuado para el óptimo crecimiento de las microalgas, éstos incluyen el diseño de biorreactores, así como el aislamiento y la deshidratación de la biomasa para su procesamiento.

Uno de los aspectos importantes a controlar es la manera en la que se lleva a cabo la conversión bioquímica de los macronutrientes que son sintetizados dentro de la biomasa, ya que, el contenido de macromoléculas que sintetizan las microalgas se ve afectado por el entorno donde crecen, es decir, pueden sintetizar más o menos lípidos, carbohidratos o proteínas si se encuentran bajo un estado de estrés. Existen ciertas estrategias de cultivo que pueden modificar la composición bioquímica de las microalgas, como la disponibilidad de nutrientes en

el medio de cultivo (Rasdi & Qin, 2015). Esta disponibilidad de nutrimentos va a depender del medio en el que se encuentren los microorganismos.

Las funciones de las proteínas en las microalgas suelen ser estructurales y metabólicas, las primeras se encuentran inmersas en las membranas lipídicas de algunas cianobacterias, dentro de las funciones metabólicas son utilizadas como catalizadores enzimáticos del metabolismo celular por lo que facilitan el crecimiento microalgal; así mismo intervienen en el ensamblaje de las moléculas de clorofila a los cloroplastos, donde se absorbe la luz.

En la siguiente tabla se muestra un perfil de aminoácidos presentes en microalgas y se hace una comparación con algunos contenidos en derivados animales o vegetales:

Table 2
Amino acid profile of different algae as compared with conventional protein sources and the WHO/FAO (1973) reference pattern (g per 100 protein)

Source	Ile	Leu	Val	Lys	Phe	Tyr	Met	Cys	Try	Thr	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	Pro	Ser
WHO/FAO	4.0	7.0	5.0	5.5	6.0		3.5		1.0									
Egg	6.6	8.8	7.2	5.3	5.8	4.2	3.2	2.3	1.7	5.0	–	6.2	11.0	12.6	4.2	2.4	4.2	6.9
Soybean	5.3	7.7	5.3	6.4	5.0	3.7	1.3	1.9	1.4	4.0	5.0	7.4	1.3	19.0	4.5	2.6	5.3	5.8
<i>Chlorella vulgaris</i>	3.8	8.8	5.5	8.4	5.0	3.4	2.2	1.4	2.1	4.8	7.9	6.4	9.0	11.6	5.8	2.0	4.8	4.1
<i>Dunaliella bardawil</i>	4.2	11.0	5.8	7.0	5.8	3.7	2.3	1.2	0.7	5.4	7.3	7.3	10.4	12.7	5.5	1.8	3.3	4.6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3.6	7.3	6.0	5.6	4.8	3.2	1.5	0.6	0.3	5.1	9.0	7.1	8.4	10.7	7.1	2.1	3.9	3.8
<i>Arthrospira maxima</i>	6.0	8.0	6.5	4.6	4.9	3.9	1.4	0.4	1.4	4.6	6.8	6.5	8.6	12.6	4.8	1.8	3.9	4.2
<i>Spirulina platensis</i>	6.7	9.8	7.1	4.8	5.3	5.3	2.5	0.9	0.3	6.2	9.5	7.3	11.8	10.3	5.7	2.2	4.2	5.1
<i>Aphanizomenon sp.</i>	2.9	5.2	3.2	3.5	2.5	–	0.7	0.2	0.7	3.3	4.7	3.8	4.7	7.8	2.9	0.9	2.9	2.9

Tabla 2. Perfil de aminoácidos presentes en diferentes fuentes de biomasa (Becker, Edward. & Kumar, 2015)

En décadas recientes el cultivo de microalgas en agua residual se emplea como una solución con menor impacto ambiental en los tratamientos de aguas, debido a la capacidad de las microalgas para utilizar el nitrógeno (N) y el fósforo (P) inorgánico para su crecimiento, así como su capacidad para eliminar algunos metales pesados, como el plomo (Markou & Nerantzis, 2013), y algunos compuestos tóxicos orgánicos para el medio ambiente acuático, como el azul de metileno (Angulo Mercado, et al. 2012), sin dejar contaminación secundaria, como es el caso de la precipitación química. Estos microorganismos producen oxígeno y provocan un efecto desinfectante debido al aumento en el pH (9-12) del agua donde viven durante la fotosíntesis en donde se da lugar a la conversión de la energía solar en biomasa útil (Komolafe et al., 2014). La limitación de N y P por lo general provoca un aumento en el contenido de carbono celular (C), la acumulación de C en las células de microalgas puede reducir la eficiencia de utilización de los nutrientes (Molina, et. al, 1991), de este modo, la limitación de N por lo general resulta en un bajo contenido de proteínas y un alto contenido de carbohidratos, mientras que la limitación de P también puede cambiar los contenidos relativos de proteínas, lípidos y carbohidratos en las células de microalgas (Xin, et. al, 2010).

2.1.3. Aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales

Las descargas de las aguas residuales urbanas son ricas en carbono orgánico, nitrógeno, fósforo y otros minerales, que deben ser eliminados antes de su descarga a aguas receptoras, según cifras oficiales (CONAGUA, 2016), en México se trata el 52.7% de las aguas municipales que se generan, y el 32% de las aguas no municipales. Debido a esto la mayoría del agua residual sin tratar se incorpora a cuerpos de agua receptores, como lagos y ríos, teniendo efectos nocivos sobre los ecosistemas, entre algunos se alteran los niveles de materia orgánica, nitrógeno (N) y fósforo (P), propiciando el agotamiento del oxígeno disuelto, la toxicidad para la vida acuática y la eutrofización del cuerpo de agua receptor (Cho et al., 2013a). Según las proyecciones, en 2030 habrá 9.2 mil millones de metros cúbicos de aguas residuales que, de ser tratadas y reusadas, reducirían en un 40% la demanda. Es por esto se debe de llevar un adecuado tratamiento del agua residual urbana, el cual requiere de ciertos procesos físico-químicos como tratamiento primario; que consiste en la separación de los sólidos en suspensión y no disueltos en el agua por medio de técnicas como la sedimentación, filtración, flotación, coagulación-floculación. Posteriormente se somete a un tratamiento secundario que consta de un proceso aerobio o anaerobio en el que se llevan a cabo la mayoría de las reacciones de depuración de la materia orgánica a través de lodos activados, lagunas de estabilización, digestores y/o filtros biológicos. Sin embargo, el agua de salida de estos procesos, en la mayoría de los casos contiene elevadas concentraciones de N y P, por lo que requieren de un tratamiento terciario con procesos físico-químicos como intercambio iónico, precipitación química, ozonización y ósmosis inversa, resultando muy costosos. Las alternativas que existen pueden ser humedales y sistemas hidropónicos donde los nutrientes son asimilados por vegetales u otras plantas ornamentales. Otra solución es el uso de los sistemas de microalgales, ya que pueden tratar aguas residuales así como residuos ganaderos, residuos agroindustriales y desechos industriales (Arbib et al., 2013; Cho et al., 2013b; Gouveia et al., 2016; Mayers, et al 2014a; Rai et al., 2005; Wu, et al, 2015).

Estos cultivos de microalgas tienen una amplia gama de propósitos, dentro de los que se encuentran la transformación de los contaminantes del agua a biomasa microalgal, la eliminación de algunas bacterias debido al aumento del pH por el proceso fotosintético, al haber una constante producción de oxígeno la materia orgánica presente se continúa degradando, por todo esto se podría decir que se trata de un proceso ambientalmente sustentable (F. Ji et al., 2014)

Las microalgas de los géneros de *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Chlorella* y algunas cianobacterias como *Spirulina* han sido reportadas como especies efectivas para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales, debido a su capacidad de utilizar diferentes fuentes de N en forma de nitratos, urea y amonio, así mismo tienen la característica de resistir condiciones ambientales adversas

(Abdel-Raouf et al., 2012; Caporgno et al., 2015; Gouveia et al., 2016; Muñoz, et al., 2015; Samorì, et al., 2013),

El crecimiento de algas requiere la disponibilidad de nutrientes principales, tales como carbono, nitrógeno, fósforo y micronutrientes, que pueden ser costosos si tienen que ser añadidos en grandes cantidades (Caporgno et al., 2015). Además, el uso de algas para el tratamiento de aguas residuales y de forma simultánea la producción de biocombustibles o materiales de alto valor agregado también se justifica al disminuir los altos costos del tratamiento.

La principal aplicación de las microalgas en el tratamiento de agua residual es en la remoción de nutrientes como el N que ellas lo utilizan como precursor de aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofila y otros compuestos que contienen nitrógeno. Pueden incorporar el N a la célula en forma de amonio o nitrato, sin embargo, prefieren el amonio debido a que lo puede utilizar más directamente para la biosíntesis de aminoácidos. Así mismo incorporan el fósforo en forma de ATP y ADP.

Otras aplicaciones incluyen la remoción de algunos metales pesados, ya que ciertas especies de microalgas son capaces de absorber la carga iónica de estos compuestos inorgánicos, pudiendo ser un tratamiento biológico para aguas residuales de uso doméstico, industrial, agroindustrial y tratamiento de residuos agrícolas (Raouf-Abdel et al. 2012). Aunado a esto se ha reportado que las microalgas fijan grandes cantidades de dióxido de carbono, incrementando las ventajas del cultivo de dichos microorganismos en agua residual ya que además de remover los nutrientes se puede utilizar la biomasa generada para la elaboración de productos de alto valor añadido.

2.1.4. Parámetros para el cultivo de microalgas en aguas residuales.

La producción de biomasa de microalgas requiere condiciones bien definidas. Los parámetros necesarios para el crecimiento de biomasa microalgal son luz, pH adecuados, temperatura, suficiente fuente de carbono y nutrientes en el medio de cultivo (Masojídek & Torzillo, 2014). En la Figura 1 se muestra el esquema de producción de microalgas y la manera en la que estas aprovechan los nutrientes de las aguas residuales:

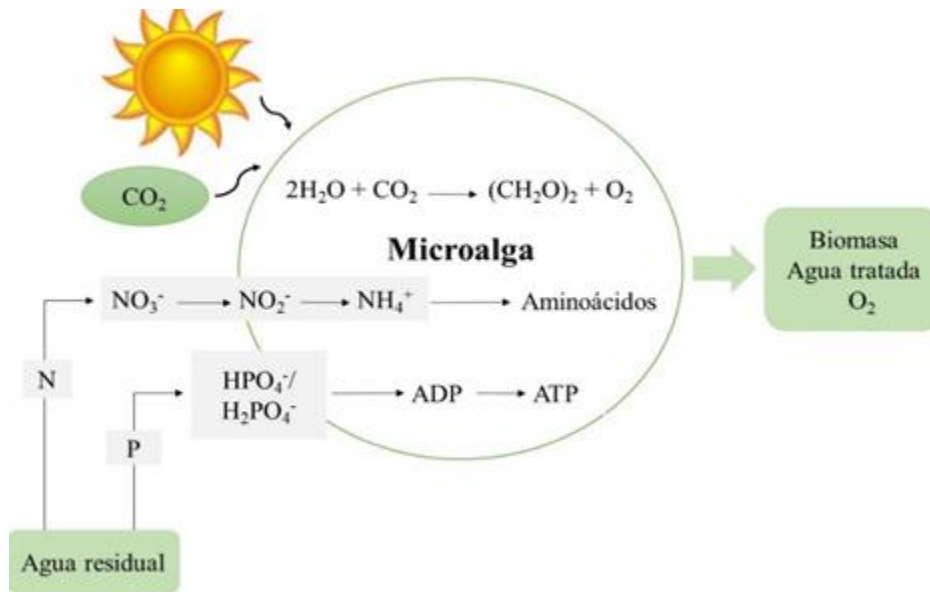


Figura 2 Esquema de producción de biomasa de microalgas

2.1.4.1. Luz disponible para el desarrollo microalgal

La luz es el factor más importante en el proceso de cultivo de microalgas. La cantidad de energía de los fotones recibidos por cada célula es una combinación de varios factores: densidad celular, densidad de flujo de los fotones, duración de la trayectoria óptica (espesor de la capa de cultivo) y la velocidad de mezcla. Dado que los cultivos masivos de microalgas crecen en suspensión densa, es necesario mezclar la solución para asegurar la exposición de las células a la luz y permitir una eficiente transferencia de masa (Masojídek & Torzillo, 2014).

Los ciclos de luz y oscuridad influyen fuertemente en el crecimiento y la eficiencia fotosintética de las microalgas. La luz natural solar es utilizada para el cultivo masivo de estas. La radiación solar es abundante en algunos lugares del mundo donde se pueden llegar a tener de 280 W/m² a 120 W/m² por año (Yin, 2008). La radiación natural tiene un espectro de luz completo, lo cual es bueno para el cultivo (Zhu, et.al, 2013). Los fotones capturados a plena luz del sol por la clorofila y otros pigmentos no se utilizan para la fotosíntesis y en su lugar deben ser disipados como calor y fluorescencia. En ausencia de limitación por nutrientes, la fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica, hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación por luz (Ji et al., 2015). Pasado este momento, se alcanza el punto de fotoinhibición, con resultados perjudiciales para la misma célula e incluso su muerte, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo (Hernández-Pérez & Labbé, 2014)

2.1.4.2. Temperatura Ideal

La temperatura es otro de los parámetros importantes a controlar en el cultivo de microalgas. Existen algunos géneros como *Chlorella* y *Spirulina*, que pueden tolerar un amplio intervalo de temperaturas (entre 15 y 35°C) mientras que géneros como *Haematococcus* por lo general necesitan una regulación más específica (entre 25 y 27°C). Sin embargo, para la mayoría de las microalgas de agua dulce, los intervalos óptimos de temperatura se deben mantener entre 25 y 30°C (Masojídek & Torzillo, 2014). En un sistema de cultivo cerrado, la temperatura se puede controlar por varios mecanismos, tales como rociadores de agua, inmersión del colector solar en piscinas, reactor dentro de un invernadero, etc. (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Por el contrario, en un sistema de cultivo abierto es más difícil de controlar, aunque se pueden realizar ciertas acciones simples para disminuir tal efecto, como cubrir los estanques con plásticos translúcidos para no impedir el paso de la luz solar al sistema.

2.1.4.3. pH óptimo

El tercer factor importante es el pH ya que influye en la abundancia del carbono inorgánico dentro de los cultivos de microalgas. Cuando se tiene un pH inferior a 5 en los cultivos la mayor parte del carbono inorgánico se encuentra en forma de CO_2 , mientras que cuando este es igual a 6.6 las concentraciones de CO_2 y HCO_3^- se encuentran en equilibrio (Cho et al., 2013a). Por otro lado, en cultivos con pH superior a 8.3, la mayor parte del carbón inorgánico se encuentra en forma de HCO_3^- (Xin, et. al, 2010). Por lo tanto, el pH debe ser controlado durante el cultivo para mejorar la capacidad de absorción y la utilización de CO_2 por las microalgas, ya que el proceso fotosintético del CO_2 provoca un aumento gradual del pH del medio debido a la acumulación de radicales hidroxilo (OH^-) en el medio (García Estrada, 2014). El pH para el cultivo de microalgas se encuentra en un intervalo entre 7 y 9, el valor óptimo se encuentra entre 8.2 y 8.7 y va a variar en función de la especie de microalga que se desee proliferar. La mayoría de las microalgas crecen en aguas residuales industriales alcalinas a excepción del tratamiento con aguas residuales recalcitrantes que se obtienen de la producción de etanol y ácido cítrico (Zhu, et.al, 2013). Por otra parte, el contenido de proteínas y pigmentos contenidos en la biomasa de las microalgas varía con el valor de pH en el cultivo. Además de esto la regulación del pH en el medio de cultivo se aplica como estrategia para evitar su contaminación con cianobacterias u otros organismos.

2.1.4.4. Macronutrientes esenciales para el ciclo de vida microalgal

La mayoría de las microalgas necesitan de carbono inorgánico en su forma de CO_2 para su crecimiento, además de otros nutrientes tales como oxígeno (O), hidrógeno (H), nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), azufre (S), fósforo (P) y elementos traza. Los nutrientes de mayor importancia son: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, y potasio. El carbono inorgánico se puede proporcionar en forma de CO_2 , carbonatos, bicarbonatos y compuestos orgánicos de carbono, normalmente se añade por aireación, agitación magnética y en algunos casos, se burbujea una mezcla de aire y CO_2 a través del medio de cultivo a una velocidad específica, generalmente se realiza con la ayuda de bombas de aire (Rasdi & Qin, 2015). El N y P se convierten en elementos limitantes, ambos desempeñan un papel en el control de la relación de crecimiento y la producción de proteínas en las microalgas (Zhang, et. al, 2014).

Después del carbono, el nitrógeno es uno de los elementos esenciales para el crecimiento, desarrollo, reproducción y otras actividades fisiológicas de las microalgas, generalmente representa del 7-10% del peso seco de las células, es un constituyente esencial de todas las proteínas estructurales y funcionales en las células microalgales (Rhee, 1978). Por lo general las sales de amonio, nitratos y urea se utilizan como fuentes de nitrógeno, pero sus tasas de absorción y

utilización son diferentes. Los experimentos realizados hasta la fecha demuestran que la absorción del nitrógeno se da en el siguiente orden:

amoníaco → urea → nitrato → nitrito.

Esto es porque el amoníaco se utiliza directamente para sintetizar aminoácidos, mientras que las otras fuentes de nitrógeno tienen que ser convertidos a amoníaco para así poder sintetizar aminoácidos (Pancha et al., 2014).

El P es otro macronutriente importante que juega un papel importante en procesos metabólicos celulares mediante la formación de muchos componentes estructurales y funcionales necesarios para el crecimiento y el normal desarrollo de microalgas. Además, participa en muchos procesos metabólicos, como la transducción de señales, transformación de la energía y la fotosíntesis, el mecanismo metabólico de las diferentes formas de P son variadas en todas las microalgas (E. Zhang, et. al, 2008). La forma de fósforo que es más fácilmente absorbida y que promueve significativamente el crecimiento de las microalgas son los ortofosfatos. Los ortofosfatos se incorporan a compuestos orgánicos mediante diversos tipos de fosforilación. Por otra parte también puede acumularse en las células en forma de polifosfatos, donde se almacenan en forma de gránulos (C. Zhang, et. al, 2014). Estos gránulos de polifosfato aparecen a menudo en células normales que crecen bajo condiciones de suficiente concentración de fosfato, pero desaparecerá una vez que el fosfato se vuelve deficiente. La tasa de crecimiento de las microalgas aumenta junto con la concentración de P y lo contrario ocurre cuando la concentración es demasiado alta, lo que puede ser debido al cambio de la relación N/P lo que inhibe la división celular de las microalgas (Arbib et al., 2013).

2.2. CAPITULO 2. BIOPOLÍMEROS

2.2.1. Materiales con base biológica

Existen diversas posibilidades para la clasificación de los materiales poliméricos, de acuerdo a su procedencia se pueden catalogar en naturales (biopolímeros) o sintéticos. Los polímeros sintéticos son fabricados por el ser humano para obtener mejores materiales con diversas aplicaciones, en muchos casos imitando a los productos naturales, se obtienen mayormente a partir de derivados del petróleo o del gas natural, y algunos ejemplos son: el polietileno, poliamidas alifáticas, poliésteres, propileno, entre otros.

Muchos de los polímeros naturales pueden ser sintetizados a gran escala, como el 1,4-cis-poliisopreno (caucho). La celulosa, los fosfolípidos y muchas proteínas (como la fibroína de la seda) son biopolímeros.

Las tres clases principales de biopolímeros son: polisacáridos, lípidos y proteínas (Younes, 2017). Cada una de estas macromoléculas pueden tener aplicaciones industriales si se procesan, por ejemplo, los polisacáridos se pueden utilizar para producir bioetanol y los lípidos pueden ser transesterificados a biodiesel. Así mismo, está demostrado que las proteínas se consideran una fuente sostenible para producir alternativas biodegradables a los plásticos convencionales (Perez, et. al, 2016).

Las proteínas son heteropolímeros complejos, que ofrecen una serie de diferentes grupos funcionales capaces de formar fuertes enlaces intermoleculares y cuentan con unidades monoméricas de α -aminoácidos. Con los 20 aminoácidos más comunes encontrados en las proteínas, el número combinaciones secuenciales posible es casi ilimitado, ya que existe una amplia gama de interacciones y reacciones químicas que ocurren para la formación de estas (Pommet, et. al, 2003). Son biopolímeros que contribuyen a las funciones biológicas dentro de una célula, junto con otras macromoléculas biológicas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Se clasifican como polímeros de condensación, ya que su síntesis implica la eliminación de agua para producir un polipéptido (Jones, et. al, 2015). Juegan un papel importante en los sistemas biológicos como: biocatalizadores (enzimas), componentes estructurales de tejidos y órganos (colágeno, queratina, elastina), proteínas contráctiles (actina, miosina y tubulina), hormonas (insulina, factor de crecimiento), proteínas de transporte (seroalbúmina, hemoglobina, transferrina), anticuerpos (inmunoglobulinas), proteínas protectoras (toxinas y alérgenos) y proteínas de almacenamiento como fuente de nitrógeno y energía para embriones (Albayrak, et. al, 2014).

Además de ser importante para los sistemas biológicos, las proteínas también se utilizan en las industrias de medicamentos, alimentos y materiales (Bier, et. al, 2014). Desde la década de 1930 hasta la década de 1940 el uso de proteínas en aplicaciones de materiales aumentó significativamente, pero fue frenado por el descubrimiento de los polímeros basados en petroquímicos más baratos y más versátiles (Gómez Martínez, 2013). Sin embargo, el aumento de la conciencia ambiental ha renovado el interés en la producción de polímeros sostenibles y biodegradables a partir de proteínas de fuentes vegetales, como el gluten de trigo, y animales, como la caseína de la leche (De Graaf, 2000). Esto se ha visto estimulado aún más por el constante agotamiento de los combustibles fósiles y el grave impacto ambiental que tienen los productos derivados de éstos.

Una de las características importantes de las proteínas es que si se someten a un procesamiento por calor, éstas se desnaturalizan, disocian o desenredan y éstos cambios les permiten recombinarse y entrecruzarse a través de enlaces covalente-peptídico (Mekonnen, et. al, 2013). La desnaturalización, la reticulación y la plastificación son los aspectos más importantes del procesamiento de proteínas para poder obtener películas, recubrimientos u otros materiales basados en proteínas (De Graaf, 2000). Se requieren de tres pasos principales para este proceso: el primero es la ruptura de los enlaces intermoleculares que estabilizan estos biopolímeros en sus formas nativas mediante el uso de agentes de ruptura, los cuales pueden ser químicos (cambios de pH, solubilización, dispersión) o físicos (aumento de la temperatura,); el segundo paso consta en reorientar las cadenas del polímero adicionando compuestos (como los plastificantes) que puedan reaccionar con los enlaces previamente desestabilizados permitiendo las interacciones intermoleculares y el reordenamiento; y finalmente, para estabilizar la red tridimensional mediante la ayuda de fuerzas externas, como es el caso de la extrusión o el moldeo con calor (Fernández-Espada Ruiz, 2016)

2.2.2. Plastificantes

Según la definición de la IUPAC así como por la norma ASTM-D-883 “un plastificante es un material que se incorpora a un plástico o elastómero para facilitar su procesado y mejorar su flexibilidad”. Normalmente son sustancias con un alto punto de ebullición. Los plastificantes comúnmente utilizados en la industria son: glicerol, sorbitol, propilenglicol, sacarosa, polietilenglicol, ácidos grasos y monoglicéridos. El agua también actúa como un plastificante significativo ya que tiene la capacidad de modificar la estructura del polímero. Esto significa que el contenido de humedad del material, sujeto a la humedad relativa que experimenta, tiene un efecto importante en sus propiedades (Cuq, et. al, 1997). Típicamente, las proteínas y los plastificantes se mezclan antes del termoprocesamiento, durante el cual debe formarse una masa fundida altamente viscosa. La temperatura de reblandecimiento de las proteínas normalmente está

por arriba de sus temperaturas de descomposición, por lo que el proceso depende del tipo y la cantidad de plastificante utilizado (Pouplin, et. al, 1999).

La tecnología actual descrita en patentes recientes implica principalmente la modificación química de las estructuras de proteínas, la incorporación de nuevos plastificantes y el desarrollo de nuevos procesos y equipos especializados (Gheribi et al., 2018). Además, al igual que con los polímeros sintéticos, la composición, la microestructura y las propiedades funcionales de las películas basadas en biopolímeros determinan sus posibles aplicaciones (Jerez, et. al, 2007).

2.2.3. Bioplásticos y clasificación

En años recientes se ha ido incrementando el desarrollo de nuevas alternativas para la sustitución de los polímeros sintéticos actuales, ya que el consumo mundial de los plásticos sintéticos provenientes del petróleo es más de 200 millones de toneladas por año, con un incremento anual de aproximadamente 5%. En cuanto al caso de México, la mayor demanda proviene de la industria automotriz, resultando como un valioso proveedor de autopartes, lo que ha mantenido un ritmo de crecimiento en los últimos 10 años (Góngora, 2014). Dentro de los polímeros no biodegradables encontramos ejemplos como el poliestireno, el policloruro de vinilo y el tereftalato de polietileno (PET). Las propiedades de éstos polímeros sintéticos, como la alta resistencia a la corrosión, la impermeabilidad al agua y a otros líquidos, los convierten en residuos difíciles de eliminar y por ende en un problema ambiental. El polietileno y el polipropileno, dos de los plásticos más utilizados, se estima que tardarían muchísimos años en descomponerse por procesos naturales, no obstante, la modificación genética de algunos microorganismos, el uso de enzimas y radiaciones UV, parecen ser procesos más efectivos para su biodegradación (Tokiwa, et. al, 2009). Aunque existen programas de reciclaje que implementan controles sobre la cantidad de plástico que se consume diariamente, sólo se realizan sobre un bajo porcentaje del residuo ya generado y no es una alternativa para todos los plásticos de origen petroquímico. (Pacheco, 2014)

Los bioplásticos son materiales que provienen de recursos renovables y en algunos casos presentan propiedades similares a los plásticos elaborados a partir de petróleo. La biodegradabilidad de un material no depende del origen de este, sino de su estructura química por lo que también existen bioplásticos no degradables (Luengo, et. al, 2003). El término de biodegradabilidad se define como la capacidad de un material para poder ser degradado por microorganismos en CO₂, metano, agua y en componentes orgánicos, o biomasa, los cuales pueden ser aprovechados a su vez por la acción enzimática de microorganismos u otros seres, como mohos y hongos, para producir su energía, esto lo hacen durante un periodo de tiempo relativamente corto, de meses o años dependiendo el organismo (Tokiwa, et. al, 2009).

La gran variedad de términos y productos relacionados con este tema ha hecho necesario que se genere una clasificación. Sin embargo, las diferencias entre los conceptos de “bioplásticos”, “biodegradables” y “compostables”, pueden desfigurarse ante la posible combinación de características ocasionadas por las mezclas de diferentes materiales (Reddy, et al, 2013). Por un lado, tenemos a los plásticos “bio-basados”, que provienen de fuentes renovables, es decir, que son fabricados con materia prima que es renovada en dos o menos ciclos de crecimiento, como el almidón de maíz, trigo, algunas leguminosas y tubérculos, y de la celulosa de ciertas hierbas (Jabeen, et. al, 2015). Los plásticos bio-basados no necesariamente son biodegradables y compostables. Por otra parte, los

términos “biodegradable” y “compostable” hacen referencia a la forma de descomposición (Kale et al., 2007). La diferencia principal entre ambos términos radica en el tiempo y condiciones de degradación. Los polímeros biodegradables se degradan por la acción de enzimas presentes en microorganismos tales como bacterias, hongos y algas que se encuentran dentro del medio ambiente, mientras que el compostaje es un proceso biológico donde se utilizan organismos más complejos, como lombrices criadas para ese fin, con condiciones definidas de temperatura, humedad y luz (Lambert & Wagner, 2017).

Los bioplásticos se pueden dividir en tres grandes grupos de acuerdo a su fuente de obtención: los que están hechos de biopolímeros a partir de biomasa como almidón y celulosa, los polímeros a partir de síntesis químicas utilizando monómeros obtenidos a partir de recursos naturales, como el bio-poliéster y el ácido poliláctico (PLA), y finalmente los polímeros obtenidos a partir de microorganismos, como los polihidroxialcanoatos (PHA) y los polihroxibutiratos (PHB) (Pacheco Flores, 2014). Es importante recalcar que dentro de estos grupos hay una amplia variedad de bioplásticos ya que estos se pueden generar en productos puros o mezclas de dos o más compuestos.

La elaboración de un material bioplástico implica el uso de al menos un componente de biopolímeros que puedan formar una matriz que imparta suficiente cohesión y uniformidad. Dichos polímeros pueden tener las propiedades de una estructura cristalina o amorfa (Gómez-Martínez, et al. 2009).

Además, como ya se mencionó anteriormente, se requiere un plastificante (en su mayoría glicerol) para reducir la fragilidad del polímero, permitiendo el procesamiento del material. Los plastificantes son moléculas de bajo peso molecular y baja volatilidad, los cuales modifican la estructura tridimensional formada por las proteínas. El resultado de esta mezcla es un material con propiedades termomecánicas similares a las de los plásticos procedentes de polímeros sintéticos a base de petróleo y, gracias a estas propiedades termomecánicas pueden desempeñar funciones que se le atribuyen a los plásticos sintéticos (Gómez Martínez, 2013).

Entre las técnicas que se utilizan para la fabricación de bioplásticos, el moldeo por inyección resulta ser muy adecuada para este tipo de materia prima (biomasa residual + plastificante). Existen equipos para producción a escala industrial y para laboratorio, siendo la utilizada para este proyecto la segunda. Esta máquina está compuesta por una cámara de inyección, una boquilla, un pistón y finalmente, un molde. Los materiales se colocan en la cámara de inyección, donde absorben el calor suficiente para reblandecerse y así facilitar su flujo hacia el molde; el pistón ejerce la fuerza necesaria para que el material pase a través de la boquilla y llegue al molde, el cual se encuentra a una temperatura más elevada que la cámara de inyección para promover la fijación de estructura. Cuando pasa el tiempo programado en la máquina y se ha producido una transformación química (e.g. entrecruzamiento), se extraen las piezas del molde y se obtiene un bioplástico de

la mezcla de materiales inyectados (Felix, et.al, 2014). Una vez que se obtienen del molde se someten a una serie de ensayos para determinar algunas características mecánicas, reológicas y físicas del material resultante y así poder determinar las mejores aplicaciones para dicho bioplástico.

2.2.4. Bioplásticos derivados de microalgas

En años recientes se han desarrollado diversos tipos de bioplásticos provenientes de biomasa microbiana, los más ampliamente producidos son el PHA y el PHB, sin embargo, otros poliésteres también pueden ser producidos mediante el uso de microorganismos. La mayoría de ellos requieren de enzimas biosintéticas similares dentro de su composición bioquímica para su transformación.

Existen más de 300 especies de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que incluyen los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Methylobacterium*, las cuales tienen la capacidad metabólica de biosintetizar los PHA y acumularlos en su citoplasma como fuentes de carbono y energía en la forma de gránulos (Hempel et al., 2011). El PHB puede ser producido por una cepa de *Escherichia coli* recombinada, capaz de acumular hasta un 80% de su peso seco como PHB. Además de esta bacteria, algunas cianobacterias y algas fotosintéticas se han modificado genéticamente para producir PHB (Sathish, et. al, 2014). Sin embargo, el uso del PHB obtenido a partir de la fermentación bacteriana como un polímero básico, está limitado por su alto costo de producción en comparación con algunos plásticos derivados del petróleo ampliamente utilizados (Balaji, et. al, 2013).

Actualmente se han desarrollado diversos estudios para la producción sostenible de nuevos biomateriales a partir de distintas fuentes de biomasa de microorganismos, entre ellas las microalgas. Como se ha mencionado anteriormente, su composición bioquímica permite la transformación de sus macromoléculas en nuevos materiales, esto ha sido aprovechado por diversos grupos de investigación e industrias alrededor del mundo. Por ejemplo, un estudio realizado por Zeller, (2013) y colegas, se centraron en la polimerización termomecánica de las proteínas contenidas en la biomasa de la cianobacteria *Spirulina platensis* (57% de proteína) y la microalga *Chlorella vulgaris* (58% de proteína) se mezclaron con polietileno en polvo y glicerol. Reportan que una proporción de microalgas + glicerol/polietileno de 80:20 produce un biomaterial. Todas las muestras de bioplásticos se procesaron mediante moldeo termomecánico durante 20 minutos a 150 ° C. La temperatura de procesamiento se determinó a partir del análisis termogravimétrico y la calorimetría de barrido diferencial, donde se encontró que, por encima de 170°C, la biomasa de algas se degradó significativamente. Cuando se combinaron con polietileno, las propiedades mecánicas de los plásticos derivados de la *Spirulina* fueron mejores en comparación con el bioplástico mezclado con *Chlorella*. Sin embargo, la *Chlorella* al cien por ciento tenía mejores propiedades de carga y extensión que el 100% de *Spirulina*, con resistencias a la tracción de 3 y 5.7 MPa respectivamente.

En otro estudio realizado por (Shi, Wideman, & Wang, 2012) se obtuvo un material al procesar diversos componentes como la biomasa de *Nannochloropsis* y *Spirulina* combinada con: almidón de maíz hidroxipropilado *Glucosol 800 polymer*, glicerol como plastificante y plásticos derivados del petróleo como la poliolefina, poliuretano y polietileno. La biomasa seca y los otros componentes se introdujeron

en una máquina extrusora de doble tornillo para producir mezclas y posteriormente mediante un moldeo por inyección se obtuvieron muestras a las que se le evaluaron ciertas propiedades mecánicas. Concluyendo que los artículos moldeados que contienen algas combinadas con polímeros son adaptables para diversas aplicaciones industriales como, por ejemplo, material de embalaje.

Es este tipo de aplicaciones las que han causado interés por parte de muchas industrias que utilizan el plástico convencional para empacar sus productos y se vinculan con otras empresas que produzcan este tipo de materiales, por ejemplo, la empresa holandesa *Avantium*, compañía de productos químicos renovables, ha desarrollado y patentado un proceso para convertir los carbohidratos de biomasa en un material denominado *Avantium PEF* (furanoato de polietileno), el cual tiene aplicaciones para la generación de botellas, películas y fibras plásticas, llegando a colaborar con compañías líderes mundiales como *The Coca-Cola Company* y *Danone* para el desarrollo de botellas de PEF 100% de base biológica. Los laboratorios y la sede de *Avantium* tienen su sede en Amsterdam, Países Bajos.

En la Tabla 2 se hace una compilación de productos hechos con macro y microalgas combinadas con otro aditivo polimérico artificial o natural, de igual manera se hace una revisión a las condiciones probadas por los autores.

ESPECIE DE MICROALGA /ADITIVO O PLASTIFICANTE	PRODUCTO OBTENIDO	CONDICIONES	RESULTADO	REFERENCIA
<i>Ulva armonica</i> / polivinílico	Alcohol Compósito	Moldeo por compresión Alcohol polivinílico + algas	Polímero altamente biodegradable	(Chiellini, Cinelli, Iliava, & Martera, 2008)
<i>Botryococcus braunii</i> /Polibutilensuccinato	Compósito	Biomasa residual (extracción de lípidos y proteínas) Moldeado por inyección Mezclas: 80/20, 70/30 130 ° C, 150 rpm, 2 min	Se evaluaron las propiedades de tracción, flexión e impacto de las muestras procesadas concluyendo que la biomasa de estas especies es efectiva para la fabricación de biocompuestos	(Toro, Reddy, Navia, Misra & Mohanty, 2013)

<i>Spirulina-Chlorella</i> /Glicerol	Bioplástico	Moldeado por compresión 20 min, 150 °C	<i>Chlorella</i> presentó un menor grado de compatibilidad con el polietileno, como lo hizo la <i>Spirulina</i> .	(Zeller, Hunt, Jones, & Sharma, 2013)
<i>Porphyra columbina</i> (alga roja)	Bioplástico	Proceso húmedo (dispersión formadora de película)	Al combinarse con ficobiliproteínas y ficocoloides, aumentaron las propiedades mecánicas de las películas.	(Cian, Salgado, Drago, González, & Mauri, 2014)
<i>Laminaria digitata</i> <i>Ascophyllum nodosum</i>	Película	Extractos ricos en carbohidratos, Proceso húmedo Glicerol al 30%, 35 °C, 24 h.	Películas obtenidas con extractos ricos en proteínas tienen mayor reticulación, permeabilidad y resistencia mecánica.	(Blanco-Pascual, Montero & Gómez-Guillén 2014)
<i>Nannochloropsis-Celulosa/AmimCl</i>	Película	Biomasa residual (biodiesel) Proceso húmedo: 80 °C, 12 h Mezclas 0, 20, 40, 60, 80, 100	Películas con buenas características térmicas y mecánicas.	(Yang, et al, 2016)

<i>Nannochloropsis PVA</i>	<i>salina-</i>	Biocomposito	Biomasa residual (Biodiesel) Proceso húmedo 90°C , 1 h Mezclas 5,10, 15 y 20%	Mejoraron las características térmicas y mecánicas del material obtenido	(Tran, Lee, Jung, Park & Yang, 2016)
<i>-Nannochloropsis gaditana/ PBAT</i>		Compósito	Biomasa residual (biodiesel) Extrusión 140 °C, 2 min, 100 rpm Mezcla: PBAT/RMB 90/10, 80/20, 70/30.	Polímero altamente biodegradable.	(Torres, Navia, Campbell, Cooke, Misra & Mohanty, 2015)
<i>Nannochloropsis/ Plancton</i>		Bioplástico	Moldeado por compresión Polipropileno y Polietileno Mezclas 50/50 150 °C, 20 min, 24 kPa	Las muestras termoplásticas pueden conducir a un intervalo de propiedades mecánicas para aplicaciones dirigidas.	(Wang, Mandal, Ayton, Hunt, Zeller & Sharma 2015)

Tabla 3. Compilación de diferentes publicaciones donde se obtienen materiales poliméricos a partir de fuentes de biomasa microalgal combinadas con diferentes aditivos y plastificantes.

2.3. CAPITULO 3 PROPIEDADES DE LOS MATERIALES Y PRUEBAS DE RESISTENCIA

2.3.1. Propiedades de los materiales poliméricos y reología.

Las propiedades de los materiales son el principal aspecto tecnológico para poder encontrar aplicaciones ingenieriles. La adecuada selección de los materiales conlleva a la competitividad de cualquier producto industrial. Al clasificar un material se debe distinguir entre las propiedades mecánicas, físicas y químicas (Martín, 2012).

Se denominan propiedades mecánicas al comportamiento del material cuando le es aplicada una fuerza. Describen la manera en la que el material soporta algún tipo de fuerza, como de: tracción, compresión, flexión, torsión, cizalladura, impacto y resistencia a líquidos y solventes.

Las propiedades físicas, son las características propias del material, como el color, índice de refracción, densidad, capacidad calorífica, peso específico, punto de fusión. Pueden dividirse en eléctricas, magnéticas, térmicas y ópticas en función del tipo de estímulo al que se someta el material.

A las manifestaciones que le ocurren al material durante una reacción o proceso químico, por ejemplo, el comportamiento de corrosión o degradación de los materiales (estabilidad ambiental), se les denominan propiedades químicas.

Finalmente, las propiedades tecnológicas son el conjunto de características relacionadas con el comportamiento del material durante los procesos de conformado y fabricación. Entre ellas se encuentran la ductibilidad, maleabilidad, colabilidad, soldabilidad, maquinabilidad, dureza. Algunas de las propiedades tecnológicas pueden ser propiedades mecánicas y físicas también (Martín & Arribas Arribas, 2012)

La reología estudia los flúidos. Diferentes materiales se comportan de manera distinta cuando son sometidos a un mismo nivel de carga. El comportamiento mecánico de un material es el reflejo de la relación entre su respuesta o deformación ante un esfuerzo o carga aplicada. Los ensayos dinámicos consisten en la aplicación de un esfuerzo sobre las muestras el cual se grafica con la deformación que va teniendo el material a lo largo de la prueba, y así evaluar el comportamiento del material.

La clasificación reológica de los materiales va desde fluidos viscosos a sólidos elásticos, pasando por aquellos con propiedades reológicas intermedias (materiales viscoelásticos). El comportamiento de un mismo material puede variar dependiendo de las condiciones en las que es sometido. Por ejemplo; una sola piedra se comporta como un sólido, sin embargo, si se somete a vibración puede deshacerse y comenzar a comportarse de forma similar a un fluido. Finalmente, que un cuerpo se comporte como un sólido o como un líquido va a depender de la magnitud de la fuerza que se le aplique (Fernández-Espada Ruiz, 2016).

Este tipo de respuesta también depende de la cantidad de tiempo involucrado en el experimento. Esto es, que un mismo material puede comportarse como viscoso o como elástico, así, la comparación del tiempo en el que es aplicada la fuerza nos ayuda a clasificarlo. En general, cuando más rápida sea la deformación más se asemejará a una respuesta de tipo elástica y cuando más lenta sea la deformación, más cercana estará a viscosa.

2.3.2. Comportamiento elástico y viscoso

El comportamiento elástico suele presentarse en los sólidos, que se van deformando bajo la acción de pequeñas fuerzas externas, y se invierten espontáneamente cuando se eliminan las fuerzas. La ley de Hooke describe las propiedades reológicas de este tipo de materiales, establece que la fuerza aplicada es directamente proporcional a la deformación, y que es independiente a la velocidad a la que tiene lugar esta última. Sin embargo, existen materiales en los que la fuerza y la deformación no tienen una dependencia lineal, y por tanto no obedecen esta ley. Cuando la deformación es proporcional a la fuerza que la produce, se dice que se tiene una tensión, la cual puede ser calculada multiplicando la deformación relativa por el módulo de elasticidad (Perez, et.al, 2016).

El módulo de elasticidad también es conocido como el módulo de Young, el cual expresa la deformación longitudinal relativa que es causada por un esfuerzo de tracción o compresión. Si se alarga la longitud de un cierto valor (L) a otro ($L+l$), el alargamiento unitario, será (l/L). A tensión constante, cuanto menor sea el módulo de Young, mayor será la deformación elástica del material (Martín, 2012).

Por el contrario, el comportamiento viscoso es característico de los fluidos. Cuando se les aplica una fuerza externa se deforman (fluyen) y este flujo es continuo mientras la fuerza esté presente, cuando la fuerza se detiene el material no regresa a su forma original. Estas propiedades reológicas responden a la ley de Newton, la cual expresa que la fuerza aplicada es directamente proporcional a la velocidad de deformación, siendo independiente a la propia deformación. Sin embargo, también hay fluidos viscosos que no responden a esta ley y que por lo tanto exhiben dependencia no lineal entre fuerza y velocidad de deformación. A estos fluidos se les conoce como no newtonianos (Fernández-Espada Ruiz, 2016).

2.3.3. Ensayos Mecánicos

Los ensayos mecánicos dinámicos comprenden diversos modos: compresión, flexión, torsión, etc., y se miden en máquinas de pruebas universales. En ellos, la deformación que se impone sobre la probeta es sinusoidal y de la forma:

$$\varepsilon = \varepsilon_0 \sin(\omega t)$$

Esta deformación lleva asociado un esfuerzo como respuesta. En el caso de materiales con comportamiento de sólido elástico, deformación y esfuerzo siguen la ley de Hooke ($\sigma = E \cdot \varepsilon$). Si el comportamiento es el de un fluido viscoso, el esfuerzo es proporcional a la velocidad de deformación según la ley de Newton ($\sigma = \eta \cdot \dot{\varepsilon}$) y el desfase es de $\pi/2$. Para materiales viscoelásticos la respuesta será intermedia, con un cierto desfase (δ):

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) = \sigma_0 [\sin(\omega t) \cos(\delta) + \cos(\omega t) \sin(\delta)]$$

La relación entre una deformación y un esfuerzo axial puede definirse como:

$$\sigma = \varepsilon_0 [E' \sin(\omega t) + E'' \cos(\omega t)]$$

con:

$$E' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos(\delta) \qquad E'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin(\delta)$$

donde, tratándose de esfuerzos axiales, E' es el módulo de almacenamiento, que representa el carácter elástico; mientras que E'' es de pérdidas, que representa el carácter viscoso de la muestra.

Adicionalmente, podemos definir la tangente de pérdidas, que es una medida de la razón de energía almacenada y disipada por cada ciclo:

$$\tan(\delta) = \frac{E''}{E'}$$

Análogamente, para esfuerzos de cizalla se definen τ (esfuerzo) y γ (deformación), de los que se derivan los módulos G' y G'' siguiendo el mismo razonamiento. (Fernández-Espada, et al., 2016) (Gómez Martínez, 2013)

Las máquinas de pruebas universales son equipos capaces de medir las propiedades mediante el control de esfuerzo y la deformación, y algunas tienen la posibilidad de aplicar esfuerzos/deformaciones muy pequeñas, mediante el uso de cojinetes de aire comprimido, lo cual hace posible que se puedan realizar ensayos no destructivos para valores de deformaciones muy bajos, así como propiedades reológicas como la viscosidad, sin embargo, no todos los equipos cuentan con estas características.

2.3.3.1. Ensayos de Tracción y Torsión

Los resultados de estas pruebas proporcionan una información de diseño básica del comportamiento mecánico del material en cuestión. Las propiedades de tracción normalmente se incluyen en las especificaciones de los materiales, y por tanto constituyen un criterio de aceptación o rechazo en base a dichas especificaciones, así como que estos valores nos permiten hacer comparaciones con otros materiales cuando uno nuevo se está desarrollando. Así mismo, las propiedades obtenidas en el ensayo de torsión se pueden utilizar para determinar constantes elásticas y poder predecir el comportamiento de un material (Philp et al., 2013).

Para realizar dichas pruebas, existen ensayos normalizados, esto quiere decir que hay normas y lineamientos que se deben de seguir (de alta o baja temperatura) con la finalidad de comparar diferentes tipos de materiales. En todos los casos, se somete una probeta del material (con forma y dimensiones establecidas) a una fuerza de tracción uniaxial creciente, registrando a cada instante la carga aplicada y la extensión o alargamiento experimentado por la probeta de ensayo (Fernández-Espada, et al., 2016).

Los resultados de las pruebas mecánicas de los materiales que se someten a ellas nos dan un panorama con el cual podríamos encontrar aplicaciones industriales y así explotar su uso.

2.3.3.2. Moldeo por compresión

Es una de las principales técnicas para transformar los materiales plásticos en productos útiles para la vida humana, como son: piezas para armar telefonía, pantallas, autopartes, artículos de uso doméstico en general como cepillos de dientes, utensilios, escobas, recogedores, entre otros

El moldeo por inyección es apropiado para todos los termoplásticos con la excepción de los fluoroplásticos de politetrafluoroetileno, las poliimidias y algunos poliésteres aromáticos. En las máquinas de moldeo por inyección, los materiales peletizados o granulados son sometidos a una temperatura suficiente para facilitar su fluidez dentro de un molde cerrado, en el que se crea la forma deseada. Cuando se enfría o una vez se ha producido una transformación química, se extraen las piezas del molde (Fernández-Espada, et al., 2016).

El moldeo por inyección tiene varias ventajas ya que permite insertos de metal, altos índices de productividad y control del acabado superficial con la textura deseada y una buena precisión en las dimensiones. La mayoría de los termoplásticos se pueden triturar y volver a utilizar el material sobrante.

3. HIPÓTESIS:

La biomasa que se genera de un consorcio microalgal utilizado en el último proceso de un tren de tratamiento de aguas residuales podría ser procesada termomecánicamente junto con un plastificante para la obtención de un producto con características de un material bioplástico.

4. OBJETIVO GENERAL:

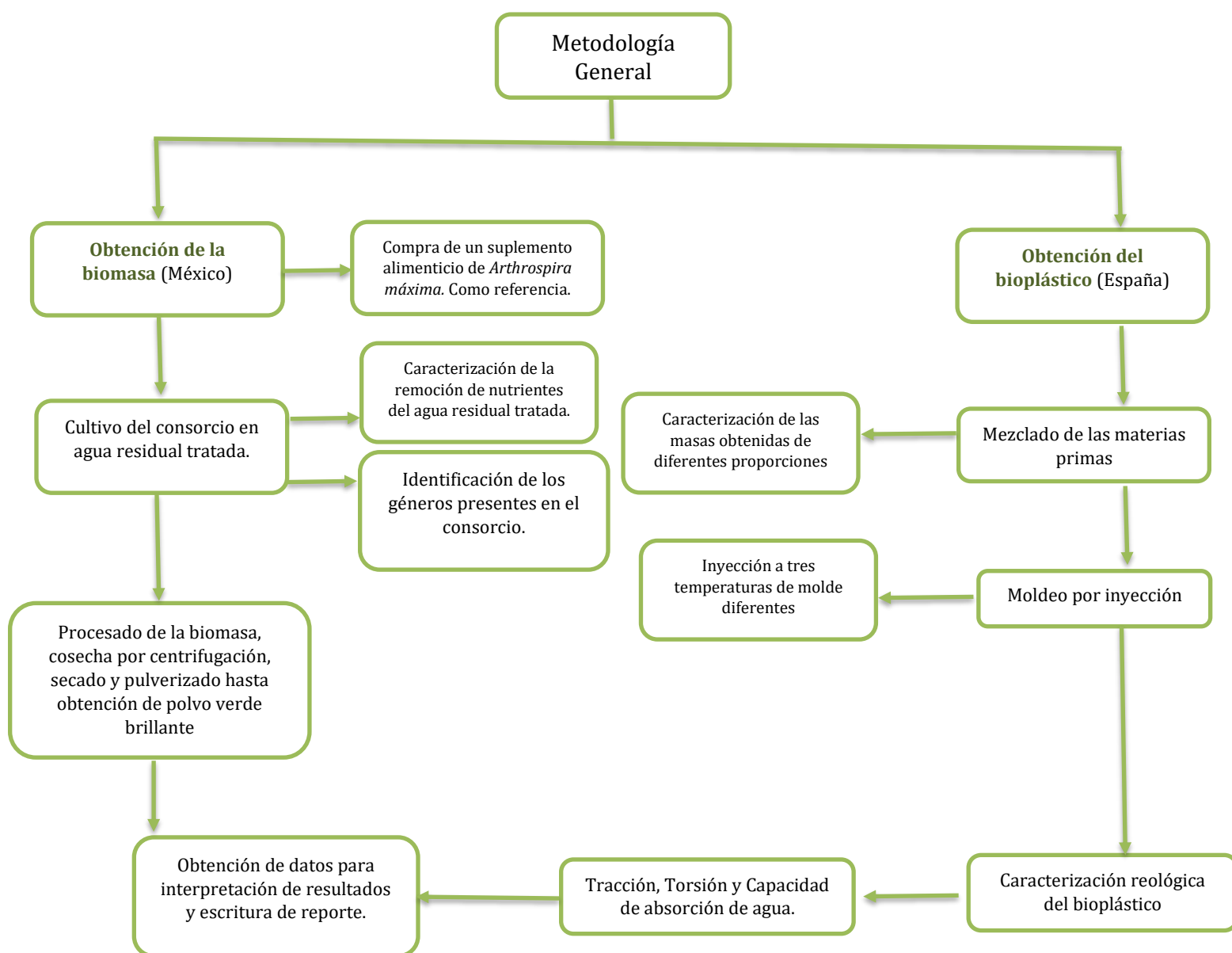
Obtener un biomaterial mediante un proceso de inyección en molde a partir de la biomasa de un consorcio de microalgas y cianobacterias cultivadas en el agua residual tratada

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ❖ Cultivar en agua residual la mayor cantidad de biomasa, identificando las especies predominantes de microalgas o cianobacterias presentes en el consorcio mediante sus características morfológicas
- ❖ Evaluar la curva de crecimiento del consorcio, así como la remoción de nutrientes del agua residual donde crece.
- ❖ Cosechar el cultivo del agua y preparar la biomasa para el mezclado con el plastificante.
- ❖ Determinar el contenido proteínico de la biomasa pulverizada para establecer una proporción adecuada entre biomasa/plastificante y obtener la mejor mezcla para el moldeo por inyección.
- ❖ Someter la mezcla obtenida a un proceso termomecánico de inyección en molde.
- ❖ Determinar las características de resistencia mecánica del bioplástico.

5. METODOLOGÍA

Parte de la metodología (como los parámetros del cultivo y las condiciones para la inyección) fue previamente probadas por los grupos de trabajo de la Dra. María Teresa Orta Ledesma del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como del grupo de investigación del Dr. Antonio Guerrero Conejo del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla, España. A manera general, se muestra un esquema de la metodología usada en el siguiente diagrama:



5.1. OBTENCIÓN DE LA BIOMASA CULTIVADA EN AGUA RESIDUAL TRATADA

5.1.1 Muestreo y Caracterización del agua de cultivo y Remoción de nutrientes del consorcio.

El muestreo del agua tratada del efluente para alimentar los cultivos se llevó a cabo cada 15 días, apegándose a los procedimientos marcados por la norma NMX-AA-003-1980 con la finalidad de que los nutrientes del agua estuvieran frescos y en condiciones óptimas para que el consorcio los pudiera metabolizar sin problemas.

Las propiedades fisicoquímicas del agua residual tratada se determinaron antes de ser administradas al cultivo de biomasa y después de haber sido cosechadas con la finalidad de evaluar la remoción de los nutrientes del agua residual tratada, así mismo el agua se sometió a un proceso previo de filtración para eliminar la mayor cantidad de sólidos suspendidos posibles que pudieran haber quedado, haciendo pasar el agua tratada a través de un embudo de sedimentación con un tapón de fibra de relleno de almohada colocado al final del embudo que fungió como filtro.

Las pruebas analíticas que se realizaron al agua residual tratada antes de añadirla al medio de cultivo y después de cosechar las microalgas ya ha sido establecidas por el grupo de investigación, éstas fueron: pH, sólidos suspendidos totales, nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, nitratos y ortofosfatos con la finalidad de evaluar la remoción por una diferencia de resultados. En la Tabla 3 se observan los métodos utilizados.

Prueba analítica	Método	Referencia
pH	Potenciométrico.	NMX-AA-008-SCFI-2016
Sólidos suspendidos totales (SST)	Uso de filtros <i>Whatman</i> de microfibra de vidrio, 1,5 micrones de poro, 4,25 cm de diámetro, secado en estufa a 103-105 °C, hasta peso constante.	NMX-AA-034-SCFI-2015

Nitrógeno amoniacal	Método titulométrico. Primero destilación de la muestra con NaOH y solución indicadora de ácido bórico en matraz del equipo Büchi, para posterior titulación con H ₂ SO ₄ 0.02N	APHA-AWWA-WPCF 4500-NH ₃
Nitratos	Reacción colorimétrica a 500nm El cadmio metálico reduce a nitritos los nitratos de la muestra. El ion de nitrito reacciona en un medio ácido con el ácido sulfanílico para formar una sal intermedia de diazonio. Esta sal se une al ácido gentísico para formar un producto de color ámbar.	HACH® Método 8039, programa 355 del equipo
Ortofosfatos	Reacción colorimétrica a 530nm. El ortofosfato reacciona con molibdato amónico para formar ácido molibdofosfórico. Después este complejo se reduce por la acción del reactivo de aminoácido y da como resultado un compuesto de molibdeno color azul intenso.	HACH® Método 8178, programa 485 del equipo.

Tabla 4.- Métodos utilizados para determinar las propiedades fisicoquímicas del agua de cultivo.

5.1.2. Cultivo del consorcio microalgal en agua residual tratada.

El consorcio microalgal utilizado en este proyecto procedió del exlago de Texcoco, Estado de México. Contiene especies nativas que el grupo de trabajo ha adaptado previamente para que tengan un crecimiento en el agua residual tratada proveniente del efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales (FCPyS) dentro de Ciudad Universitaria, México. Dicha PTAR cuenta con un sistema de tratamiento con cárcamo de recepción, un tanque de igualación, un reactor biológico de lodos activados, un segundo reactor biológico aerobio de película fija, un sedimentador secundario de placas paralelas y un filtro de arena a presión. El agua que se ha tratado hasta este punto aún cuenta con un alto contenido de N y P disueltos, la cual la hace óptima para tratarla utilizando el consorcio descrito anteriormente.

Para reproducir el consorcio y obtener la mayor cantidad posible de biomasa, primero se partió un concentrado del consorcio microalgal ($\approx 50\text{mL}$) que fue disuelto en 200mL del agua residual tratada dentro de matraces Erlenmeyer de vidrio con capacidad de 500 mL donde, fueron aumentando semanalmente a matraces Erlenmeyer de vidrio con capacidad de 1L y 2L (Figura 3) posteriormente. El volumen añadido fue de medio litro del agua residual tratada hasta llegar a un volumen final de 8L , contenidos en botellas de tereftalato de polietileno (PET) recicladas, con capacidad de 10L , las cuales simulaban fitobiorreactores de sistemas abiertos por lote (Figura 4). Éstas se colocaron dentro del Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM junto a una ventana para ofrecer la mayor cantidad de luz natural posible y de este modo permitir el paso de radiación solar, además de esto, la instalación del laboratorio cuenta con lámparas fluorescentes con periodos de iluminación: oscuridad de $12:12$ horas. La luz administrada cae dentro del intervalo de luz blanca, esta medición se hizo con el luxómetro "Terrestrial Quantum Sensors" de LI-COR Biosciences que cuenta con un sensor de modelo LI-190R. Estas condiciones de cultivo han sido probadas previamente por el equipo de trabajo con resultados óptimos.

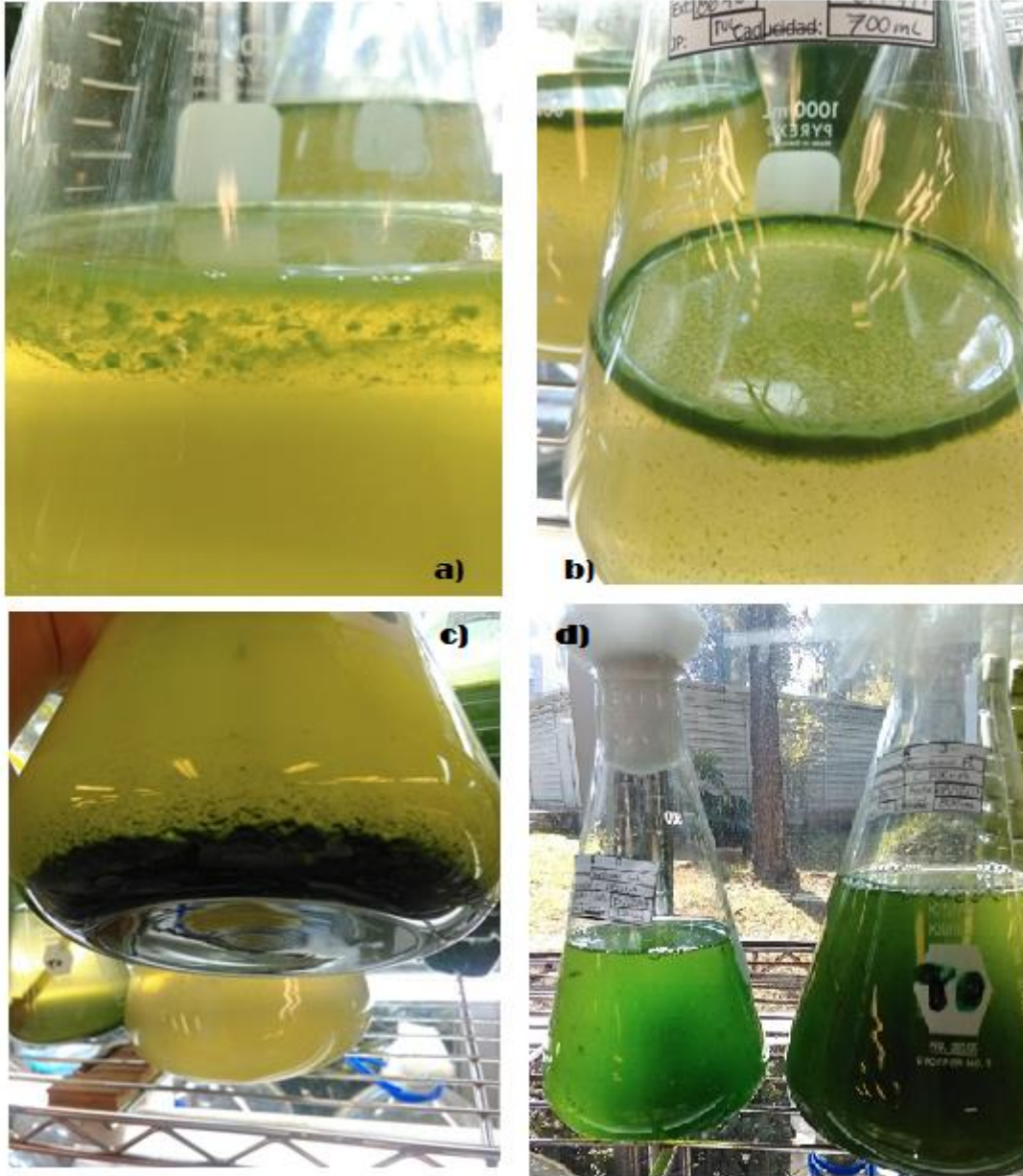


Figura 3. Crecimiento del consorcio microalgal en agua residual. a) Microalgas flotando en la superficie del matraz.. b) Matraz con microalgas en crecimiento avanzado. c) Microalgas sedimentadas por exceso de crecimiento en el fondo del matraz. d) Cultivos después de homogenizar manualmente.



Figura 4 Crecimiento de las microalgas en bioreactores abiertos por lote. a) Cultivos en matraces Erlenmeyer. b) Aumento del volumen de cultivo microalgal en sistemas abiertos.

Para realizar la curva de crecimiento se midieron los sólidos suspendidos totales de cuatro de los bioreactores diariamente durante 20 días, cuando cada cultivo contaba con una concentración (que se tomó como la inicial) de ≈ 50 mg/L, y se realizaron pruebas analíticas a cada cultivo de igual manera, se realizaron observaciones directas al microscopio vertical ubicado dentro del LIA, *Axio-Lab1* (*Carl-Zeiss, Alemania*) utilizando los objetivos de 40x y 100x para monitorear el crecimiento de las microalgas.

5.1.3. Cosechado, secado y pulverizado de la Biomasa Microalgal:

La cosecha se realizó mediante la técnica de centrifugación. Se utilizó la centrifugadora *Avanti J-26S XPI* (*Beckman-Coulter, USA*), programando las condiciones de operación a una fuerza G de 12,785 a 15°C durante 10 minutos, la biomasa fue recuperada del fondo de los frascos almacenándola en cajas Petri de vidrio, posteriormente se sometieron a un secado dentro de la incubadora con agitación *New Brunswick™ Excella® E24R* (*Eppendorf, USA*), a 35°C durante 24 horas o hasta que estuviera completamente seca. La biomasa seca fue raspada de las cajas Petri y pulverizada en un mortero de cuarzo. El polvillo obtenido fue resguardado en tubos de vidrio con rosca y en tubos *Falcon* de plástico. (Figura 5). Estas pruebas se realizaron dentro del LIA del Instituto de Ingeniería de la UNAM,

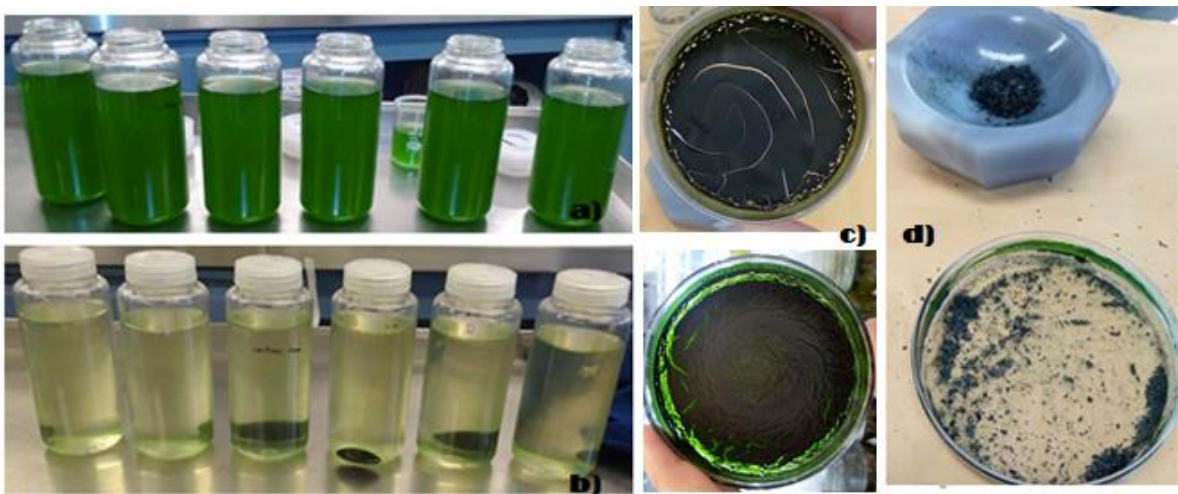


Figura 5. Cosecha y procesado de la biomasa del consorcio microalgal. a) Cultivo antes de someterse al proceso de centrifugación. b) Cultivo después de someterse a la centrífuga. c) Biomasa en estado deshidratado, después de haber estado en la incubadora. d) Biomasa pulverizada.

5.2. OBTENCIÓN DEL BIOPLÁSTICO

5.2.1 MATERIALES

Biomasa:

Se utilizó el paquete celular completo del consorcio cultivado en agua residual, compuesto principalmente por microalgas de los géneros *Scenedesmus sp* y *Desmodesmus sp*, previamente seco y pulverizado el cual tiene un color verde brillante (ver Figura 6), Esta biomasa fue obtenida dentro del LIA del Instituto de Ingeniería, UNAM, México y será denominada como CM para referirnos a ella en los análisis.

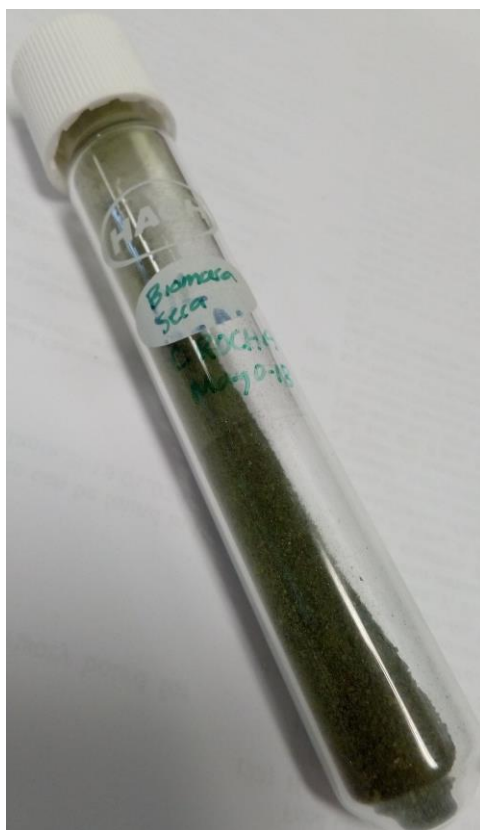


Figura 6. Biomasa seca y pulverizada recuperada del cultivo en agua residual

De igual manera, se utilizó como referencia un suplemento alimenticio de biomasa deshidratada en polvo de *Arthrospira máxima* comercializada por la empresa *Alfen Lessa Corporation S.A.* (ver Figura 7) Según la información en la etiqueta esta fue cultivada y cosechada en Chile, reportando un porcentaje proteínico de 66%. Esta biomasa será denominada como AM para el análisis de resultados.



Figura 7 Suplemento alimenticio comercial de *Arthrospira máxima*

Plastificante: La glicerina usada fue de grado Pharma de la casa *Panreac Química S.A* (España) proporcionada por el departamento de ingeniería química de la Universidad de Sevilla, España.

5.2.2. EQUIPOS

Los equipos utilizados se encuentran en dos sitios diferentes; unos se usaron dentro del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla, España, éstos fueron: la mezcladora *Haake PolyLab QC* (*Haake, Alemania*), el equipo de moldeo por inyección a escala de laboratorio *Minijet Piston Injection Moulding Sytem* (*Haake, Alemania*) y el reómetro *RSA3* (*TA Instruments, USA*) con diferentes sensores para las pruebas correspondientes. Asimismo, se realizaron ensayos en el Centro de Investigación Tecnológica e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) con el reómetro híbrido de deformación *DHR-3* (*TA Instruments, USA*) y el Analizador elemental, *TRUSPEC CHNS MICRO* (*LECO, USA*).

5.3. Mezclado de las materias primas

Se mezclaron tres proporciones de la biomasa de referencia con la glicerina, la suma de ambas fue de 65g por lo que se hicieron los cálculos necesarios para ajustar el contenido total a proporciones de biomasa/plastificante de 50-50%, 55-45% y 60-40%. Ambos componentes se introdujeron en el reómetro mezclador *Haake PolyLab QC* (*ThermoHaake, Karlsruhe, Alemania*) (Figura 8) y se combinaron durante 5 minutos a 50 rpm, monitorizando el torque y la temperatura de la cavidad del mezclador estas condiciones de operación fueron probadas previamente por el equipo de investigación de la Universidad de Sevilla.



Figura8. Reómetro mezclador en funcionamiento

5.4. Caracterización reológica de las mezclas

A las masas obtenidas se les hizo una prueba de barrido de temperatura por ensayo dinámico donde se determinó la evolución del comportamiento viscoelástico (módulo de almacenamiento, E' , y módulo de pérdidas, E'') con respecto a la temperatura. Las condiciones de ensayo fueron una frecuencia de 1 Hz, y deformaciones relativamente pequeñas dentro del intervalo viscoelástico lineal (en torno al 0,1%), calentándose la muestra a 5 °C/min desde 20 hasta 150 °C. condiciones probadas previamente por el grupo de investigación de la Universidad De Sevilla, de este ensayo se determinaron las mejores condiciones térmicas para programar en la máquina de inyección. El equipo utilizado para esta prueba fue un reómetro *RSA3 (TA Instruments, USA)* usando aproximadamente 0.5g de la masa obtenida en un sensor cilíndrico de 8 mm de diámetro. La Figura



Figura 9. Los sensores utilizados para esta prueba tienen una superficie plana que al hacer contacto con la muestra le transmiten la energía necesaria para realizar el ensayo.

9 nos muestra el equipo con el sensor usado y la muestra puesta en él.

5.5. Moldeo por inyección

Las mezclas conseguidas de las diferentes proporciones se introdujeron en una inyectora de escala laboratorio tipo pistón *Minijet Piston Injection Moulding Sytem* (ThermoHaake, Karlsruhe, Alemania) (Figura 10). La masa se introdujo en una cámara de inyección a 40°C, siendo impulsado durante 5 minutos con un pistón a una presión de 500 bares hacia el molde correspondiente, dichas condiciones fueron realizadas con anterioridad por el grupo de investigación de la Universidad de Sevilla, la temperatura del molde T_{molde} fue variada, tomando en cuenta los valores de 100°, 120° y 140°C a partir de los resultados de la prueba pasada. El molde utilizado aparece en la Figura 11, este ya tiene las dimensiones necesarias para realizar los ensayos mecánicos. A los bioplásticos (o probetas) que se obtienen de este equipo se le realizaron pruebas de tracción, torsión y absorción de agua.



Figura 10. Al interior del equipo se coloca primero el molde seguido de la cámara de inyección, la cual recibe el impacto del pistón para la distribución del material en el molde.



Figura 11. Molde rectangular de acero inoxidable con las medidas requeridas para los ensayos de deformación

5.6. Caracterización reológica del bioplástico:

Para las pruebas realizadas se utilizaron dos reómetros, el reómetro de esfuerzo controlado *RSA3* dónde se realizaron las pruebas de tracción (Figura 12) y el reómetro híbrido de deformación *DHR-3* (*TA Instruments, USA*) donde se elaboraron los barridos de temperatura por ensayos dinámicos de torsión (Figura 13). La prueba de tracción es un ensayo destructivo que consiste en someter a una probeta de medidas normalizadas a un esfuerzo axial de tensión creciente hasta que se produzca la rotura de la probeta. Este ensayo se usa para construir un diagrama esfuerzo-deformación y para determinar propiedades mecánicas del material, como: el módulo elástico, el esfuerzo de rotura en tracción y la máxima deformabilidad del material. Por otra parte, el ensayo de torsión determina el comportamiento de materiales sometidos a cargas de giro. En este caso, siguiendo el método y las condiciones probadas por el grupo de trabajo de la Universidad de Sevilla, las probetas se calentaron a una frecuencia constante de 1 Hz y una deformación dentro del intervalo viscoelástico lineal a un barrido de temperatura desde -30 a 140 °C a 5 °C/min. Para poder estudiar la repetividad de los resultados, y que éstos fueran más confiables, los ensayos se realizaron al menos por triplicado en ambos reómetros.



Figura 12. Los sensores usados para esta prueba son de tipo prensa y retienen el material a evaluar.



Figura 13. Una vez que se coloca la muestra se cierra el equipo y se inicia el ensayo.

5.7. Capacidad de absorción de agua

Para determinar la capacidad de absorción de agua y la pérdida de material soluble durante una etapa de inmersión en agua de las probetas se sigue el protocolo de la normativa ASTM D570 (2005) UNE-EN ISO 62:2008.

Para ello, las probetas se pesan inicialmente y se meten en una estufa a 50°C hasta peso constante, posteriormente se sumergen en agua destilada durante 24h (Figura 12). La capacidad de absorción de agua se calcula como el porcentaje del agua absorbida con respecto a la masa inicial de la probeta mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de la capacidad de absorción de agua} = \frac{s2 - s1}{s1} * 100$$

Donde s1 es el peso de la probeta después de pasar 24h en un horno a 50°C y enfriada en un desecador y s2 es el peso de la probeta después de haber pasado 24h sumergidas en agua destilada, donde también se vuelve a medir para calcular el cambio de volumen.

Para calcular la pérdida de material soluble en agua, en porcentaje, se hace pasar a la probeta sumergida nuevamente por la estufa a 50°C durante 24h para obtener el peso final de la probeta (s3) y aplicamos la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de pérdida del material soluble} = \frac{s2 - s3}{s3} * 100$$

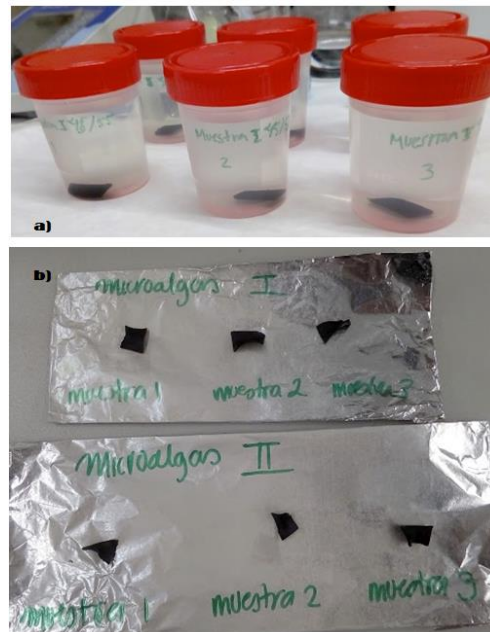


Figura 14. Prueba de Absorción de agua. a) Probetas sumergidas en agua destilada. b) Probetas posteriores al proceso de secado.

5.8. Análisis Termomecánico:

Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio “Reología de análisis térmicos” dentro del Instituto de Investigaciones en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. El equipo utilizado fue un Analizador Termomecánico *TMA V2.4E* de la marca *TA INSTRUMENTS*

5.9. Análisis estadístico:

El análisis de varianza (ANOVA) y las regresiones lineales de cada prueba se llevó a cabo utilizando el software *STATGRAPHICS*

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Curva de crecimiento de la biomasa y remoción de nutrientes del agua residual

La prueba de sólidos suspendidos totales (ver Figura 15), nos permitió calcular la cantidad de biomasa que se iba generando a partir del crecimiento en el agua residual tratada. y así determinar el mejor día para la cosecha del consorcio, este fue aproximadamente a los 15 días de haber crecido en los reactores de 10L abiertos alcanzando una concentración de $\approx 500\text{mg/L}$



Figura 15. Prueba de sólidos suspendidos totales

La Figura 16 presenta una gráfica donde se puede observar que durante los primeros nueve días de cultivo existe un crecimiento elevado de las microalgas, así como una remoción continua de los nutrientes. Aunque a partir del día nueve la concentración de nitrógeno amoniacal comienza a disminuir, se tiene la presencia de nitrógeno en forma de nitratos, debido a esto las microalgas continúan reproduciéndose, pero a menor velocidad. La razón por la cual el tiempo de reproducción es mayor cuando las microalgas se alimentan con nitratos, es que el amoníaco se utiliza directamente para sintetizar aminoácidos, mientras que las otras fuentes de nitrógeno como los nitratos, tienen que ser convertidos primero a amoníaco para así poder sintetizar aminoácidos.

Por otra parte, según la literatura (Mayers, et al, 2014), la remoción de ortofosfatos es dependiente de la remoción de nitrógeno, en los datos obtenidos esto se puede observar claramente, teniendo como resultados la remoción de 1 mg/L de ortofosfatos por cada 3 mg/L de nitrógeno amoniacal, estos datos se obtienen al día nueve de cultivo. Al final del experimento se logran remover el 83% del total de ortofosfatos y se podría decir que se consume completamente el nitrógeno del agua residual (98.9%).

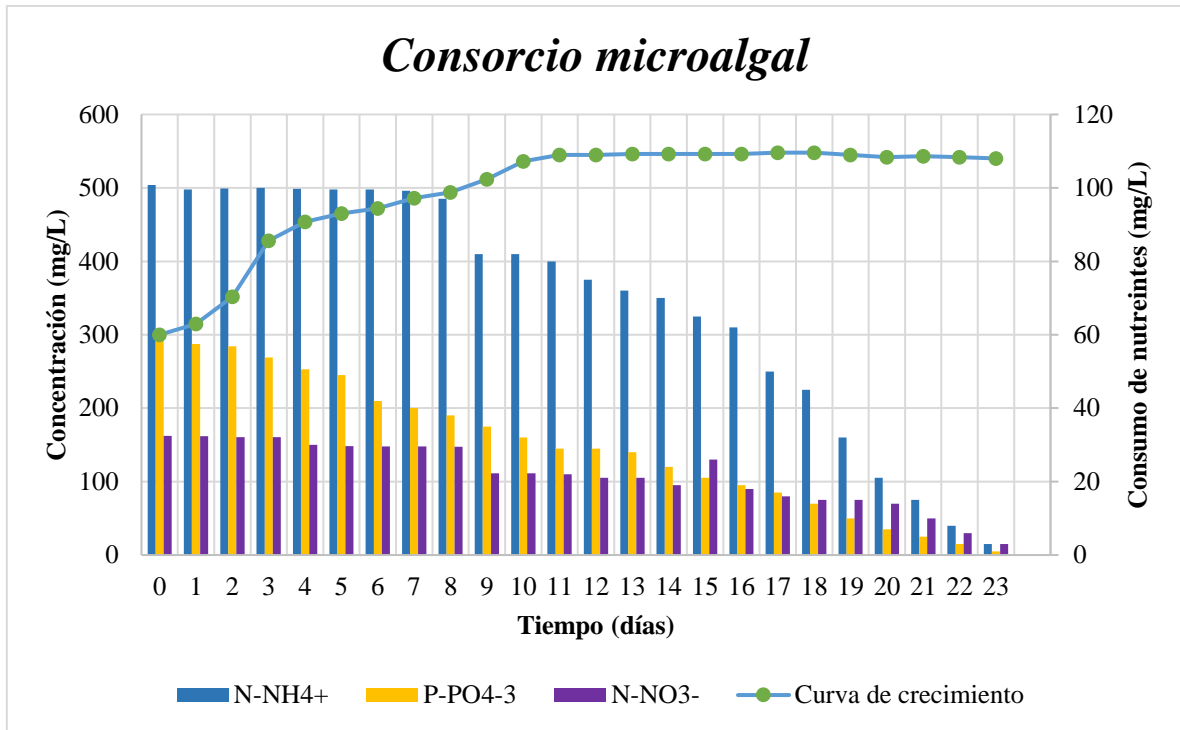


Figura 16.- Curva de crecimiento y remoción de nutrientes del consorcio microalgal.

6.2. Cultivo de la biomasa, crecimiento de las microalgas:

A partir del concentrado inicial del CM sedimentado se llegó a un total de 10 lotes en el periodo de septiembre de 2017 a junio de 2018 obteniéndose un total de **110g** de biomasa recuperada del agua residual tratada mediante la centrifugación.

Así mismo, los cultivos se monitorearon constantemente utilizando una cámara acoplada al microscopio y mediante el *software* integrado, *ZEN*, se tomaron capturas de las observaciones en tiempo real. La Figura 17 muestra el crecimiento en los cultivos durante diferentes días. La muestra observada se tomó después de homogenizar manualmente los lotes, con la finalidad de poder identificar la mayor cantidad de ejemplares presentes en el consorcio.

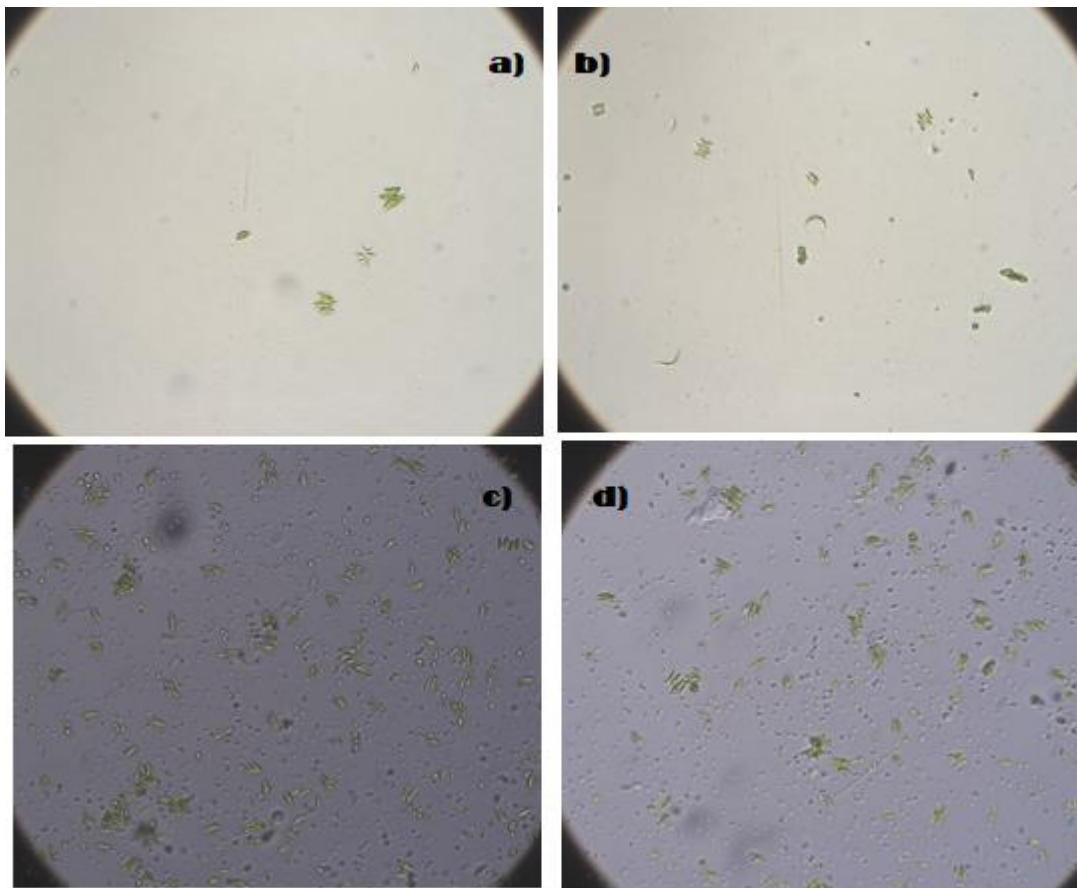


Figura 17. Crecimiento de las microalgas en el agua residual tratada. a) Día 2 después de alimentar el cultivo con el agua residual tratada. b) Día 4 sin alimento. c) Día 9 de crecimiento. d) Día 15 de crecimiento.

6.3. Identificación de los principales géneros del consorcio:

Para la determinación taxonómica de las principales microalgas contenidas en el CM sólo se tomaron en cuenta algunos de los caracteres morfológicos como, la agrupación y el tamaño de las células, el arreglo de las espinas y del cenobio así como la presencia de otras ornamentaciones. Se utilizaron las claves taxonómicas oficiales de Hindák (1990) y Hegewald y Silva (1988), en las Figuras 18 y 19 se observan las especies predominantes en cada cultivo teniendo una mayor proliferación de *Scenedesmus*. y de *Desmodesmus*, respectivamente.

En la Figura 20 se observan ejemplares de posibles cianobacterias filamentosas que fueron parte del consorcio cultivado en el agua residual, formaban una capa fina en la superficie de los reactores por lote, sin embargo, al no poder definir sus características genómicas exactas no se pueden identificar con exactitud, por lo que se ha propuesto que se trata de los géneros: *Arthrospira* u *Oscillatoria*. Así mismo en la Figura 21 se observan subespecies de los géneros *Scenedesmus* y *Desmodesmus*, los cuales fueron los predominantes en todos los cultivos en lote observados al microscopio.

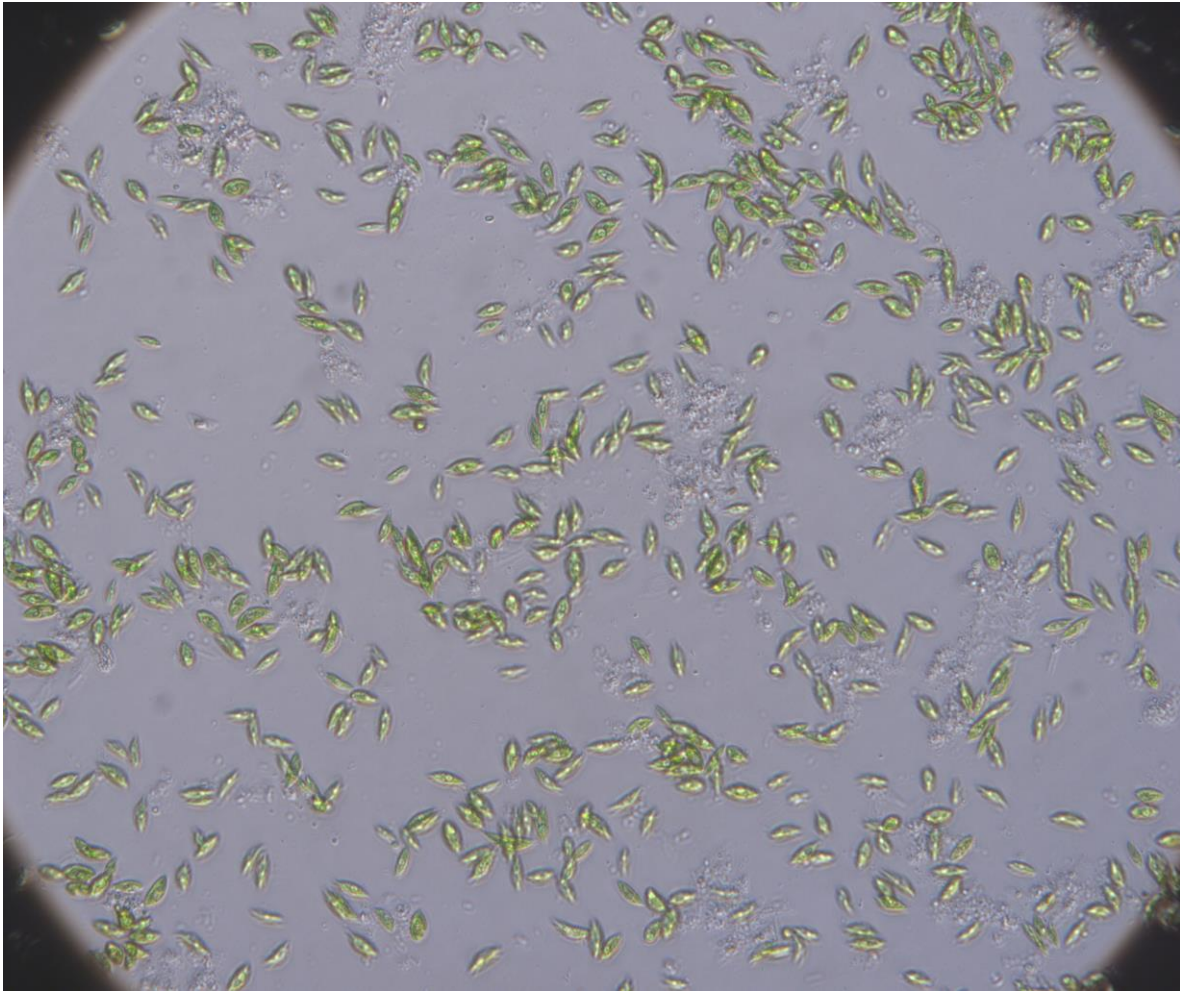


Figura 18. Microalga *Scenedesmus* sp. vista bajo el microscopio electrónico con el objetivo 40x. Algunas presentan la típica agrupación en pares o más, así como la forma alargada característica de la especie.

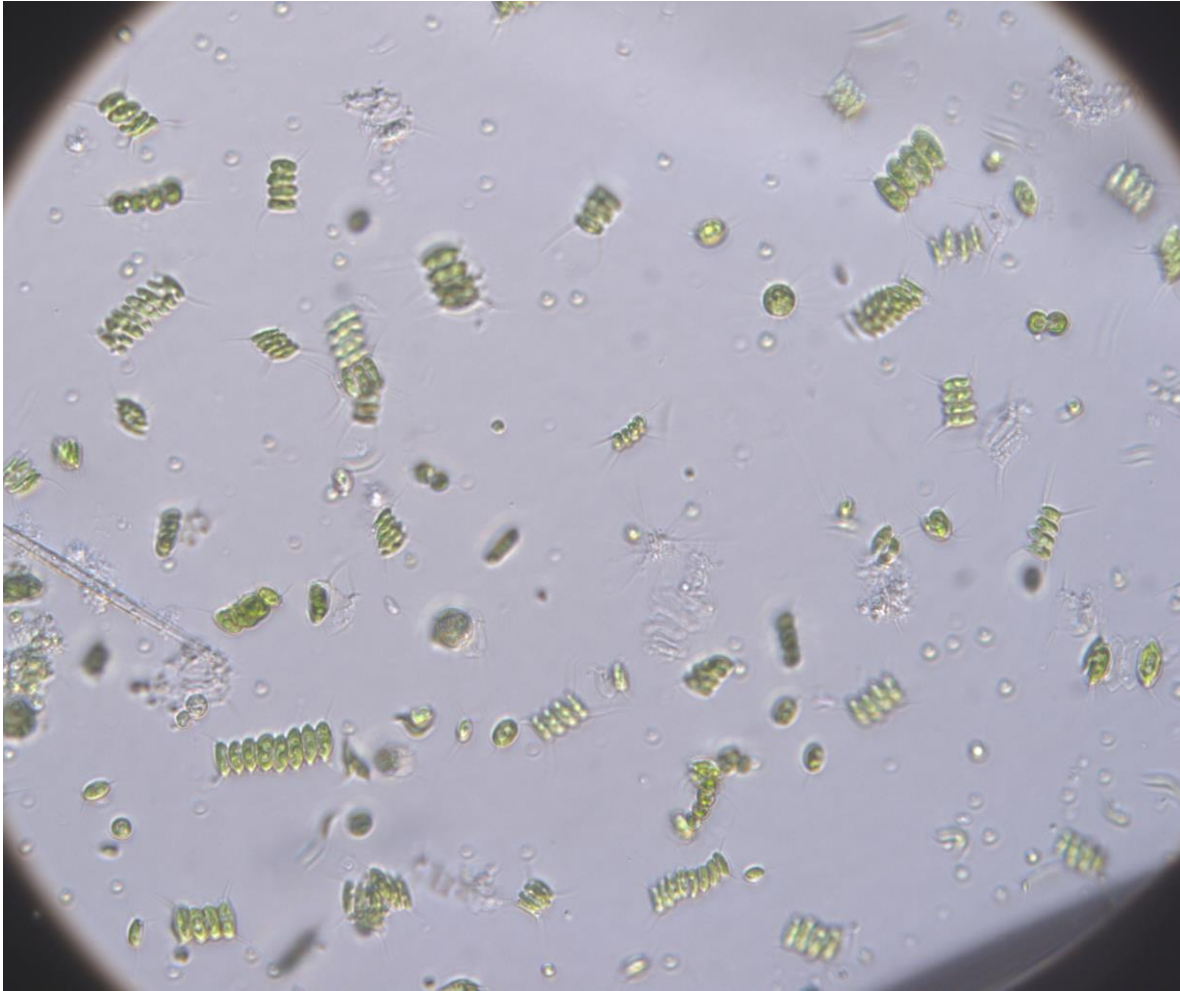


Figura 19. Microalga *Desmodesmus* sp. vista bajo el microscopio electrónico con el objetivo 40x. Se distinguen perfectamente las cuatro espinas características de la especie en los extremos de cada agrupación de microalgas.

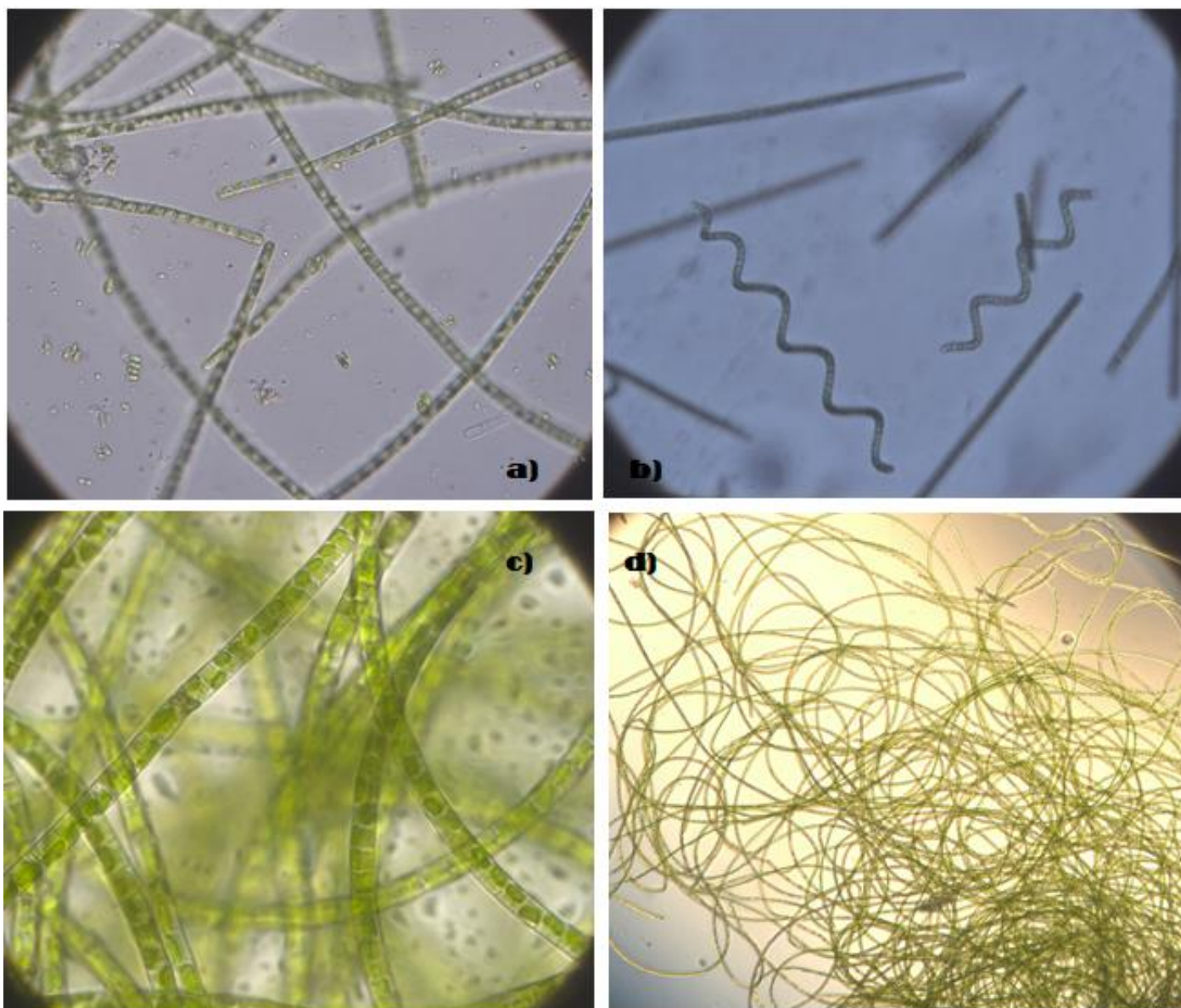


Figura 20. Microalgas y cianobacterias observadas en los cultivos alimentados con agua residual tratada. a) en la parte inferior izquierda de la imagen se observan especies de *Scenedesmus*, los filamentos observados en el resto de la imagen son posiblemente del género *Oscillatoria*. b) *Spirulina* y *Arthrospira*. c) Filamentos de microalgas donde se observan los plastos celulares. d) Filamentos formados en la superficie de los cultivos.

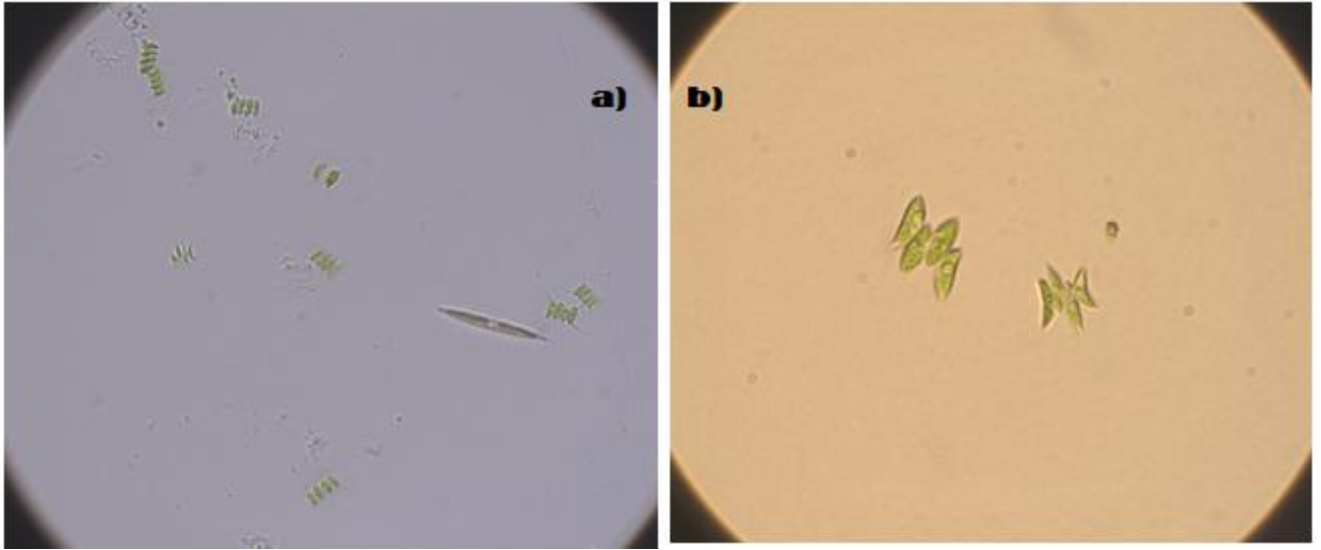


Figura 21. A) *Desmodesmus* y especies no identificadas. B) dos variedades de especies de *Scenedesmus*.

6.4. Microanálisis de la biomasa

El estudio se hizo mediante el analizador elemental ubicado en el Centro de Investigación Tecnológica e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) obteniéndose las siguientes proporciones de los elementos carbono (C), hidrógeno (H) y nitrógeno (N):

MUESTRA	RÉPLICA	% C	% H	% N
BIOMASA MICROALGAL	1	40.05	6.109	7.753
	2	40.52	6.189	7.817
	3	39.53	5.971	7.626
	Promedio	40.033	6.090	7.732

Tabla 5. Resultado de microanálisis de biomasa microalgal empleada

Considerando el factor de Kjeldahl (6.250), y multiplicando éste por el porcentaje de nitrógeno, se estima un contenido proteínico del 48.325%, lo cual coincide con el porcentaje consultado en la literatura por (Becker, Edward. & Kumar, 2015; Chronakis & Madsen, 2011) reportan porcentajes proteínicos para las microalgas presentes en el consorcio de 46-63% dependiendo la especie.

6.5. Evolución del torque y la temperatura durante mezclado de las materias primas

Durante el mezclado se registraron los valores del torque y del tiempo registrados por el equipo. El torque nos indica de manera proporcional la forma en la que los componentes de la mezcla interactúan, a mayor rigidez de la mezcla, mayor torque necesario para mantener la misma velocidad de giro de los rotores.

Para empezar se realizó una primera prueba con la biomasa de referencia utilizando la proporción reportada por (Wuang, 2014) de 80:20 biomasa:plastificante, sin embargo, la mezcla se endureció muchísimo en el primer minuto del mezclado, atascándose entre los rodillos del equipo, por lo que se decidió rechazar dicha proporción y se propuso trabajar con 3 proporciones nuevas. Se probó primeramente 50:50 %wt de cada componente y se aumentó 5% de biomasa cada vez para tener 55:45 y 60:40 respectivamente.

Una vez que la máquina terminó de mezclar se obtuvo una masa verde oscuro homogénea (Figura 22) a la que se le hizo un barrido de temperatura antes de inyectarla en el molde.



Figura 22. Mezclador al término del tiempo programado, entre los rodillos giratorios se encuentra la mezcla de la biomasa microalgal con el plastificante

En la Figura 23 se observan cuatro gráficas correspondientes a la relación del torque y la temperatura en las diferentes proporciones de mezclas. El aumento del torque indica un endurecimiento de la muestra, por lo que no se recomienda dejarla mezclarse mucho tiempo debido a que podría quedar atascada y descomponer el equipo, o bien dejar de ser inyectable al no poder fluir hacia el molde. Las tres primeras gráficas corresponden a las mezclas de la biomasa comercial (AM) con el plastificante. En la gráfica a) se puede observar que el torque disminuye debido a que la cantidad de plastificante fue la misma que la de biomasa, produciéndose menor interacción entre ambos componentes y permitiendo el libre flujo de estos entre los rodillos del equipo, sin embargo, al ir aumentando la cantidad de biomasa se observa un aumento en el torque, lo cual indica una mayor interacción entre los componentes, al llegar a una proporción de la mezcla de 60:40 se observa que el torque comienza a disminuir, por lo que se decidió utilizar esta proporción para mezclar la biomasa del consorcio microalgal (CM) representado en la gráfica d), En esta se va incrementando poco a poco la temperatura mientras pasa el tiempo de mezclado, durante este periodo el torque se mantiene estable casi desde el momento de iniciar la prueba, lo cual indica que ambos componentes están en una masa homogénea lo que puede conducir a que la inyección en el molde se lleve a cabo fácilmente y de lugar al bioplástico. En el proceso hay presentes tanto fuerzas de cizalla como elongaciones, ello ayuda a que las proteínas que están interactuando con el plastificante se desplieguen y se puedan formar nuevos enlaces entre estos componentes. Esto puede ser debido al rozamiento de la mezcla, el cual se transforma en calor.

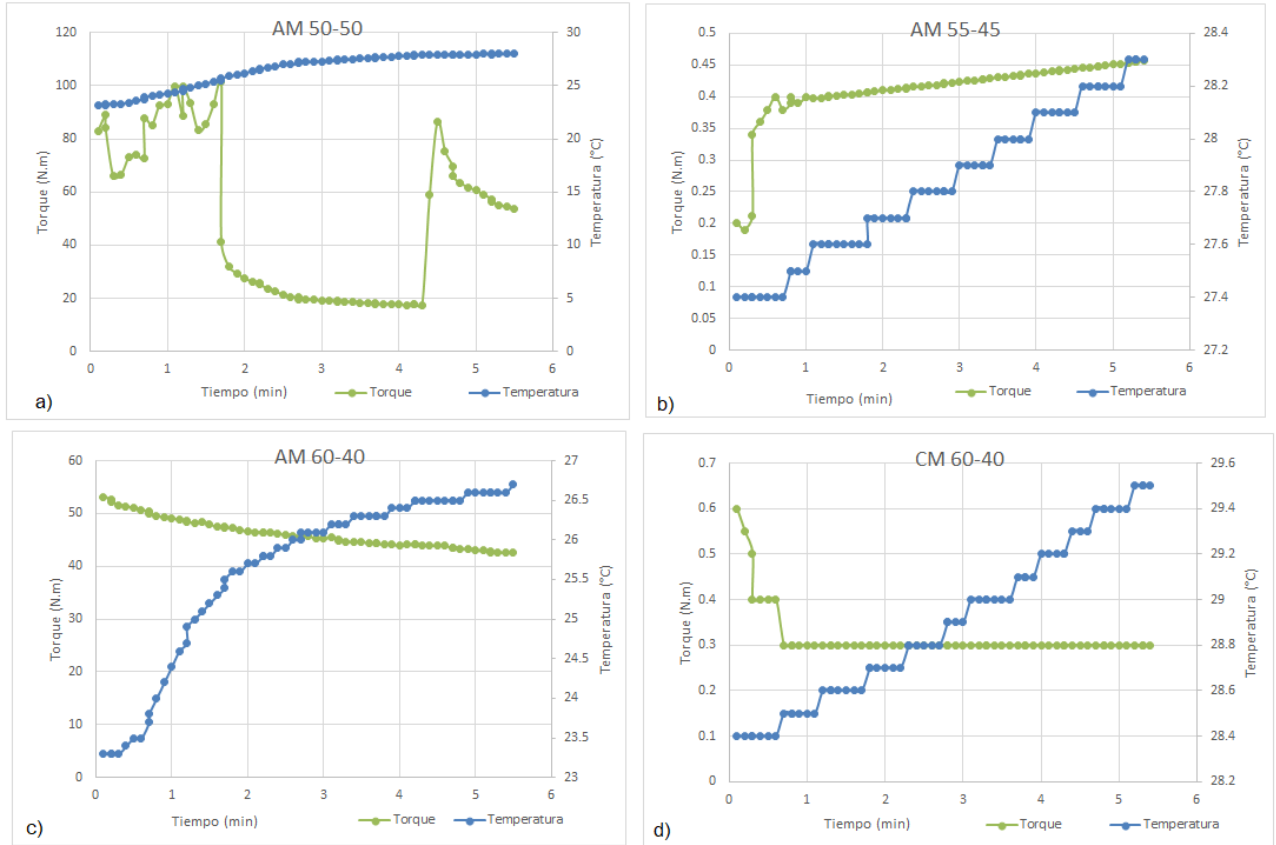


Figura 23. Gráficas para el mezclado de las materias primas. A) Mezcla de 50% biomasa comercial con 50% de glicerina. B) Mezcla de 55% biomasa comercial con 45% de glicerina. C) Mezcla de 60% biomasa comercial con 40% de glicerina. D) Mezcla de 60% biomasa cosechada del agua residual y con 40% de glicerina

La proporción que mostró tener mayor estabilidad entre torque y temperatura fue la de 60-40 wt%, por lo que se decidió utilizarla para las pruebas posteriores.

6.6. Barrido de temperatura de las masas obtenidas

La temperatura a la que se somete la mezcla es una de las variables más importantes debido a que la muestra contiene especies poliméricas altamente dependientes de la temperatura, las proteínas. La evolución de los parámetros viscoelásticos de la muestra ayuda a establecer un protocolo adecuado en la obtención del bioplástico por inyección. Con ello se determinan las temperaturas a las que hay que calentar el molde y la cámara de inyección.

La Figura 24 muestra las gráficas del comportamiento de las mezclas de AM y CM respectivamente cuando se someten a una rampa de temperatura. El intervalo de temperatura varió de los -30°C a 140°C . Con la finalidad de evidenciar la estabilidad entre el módulo viscoso y elástico sólo se representaron los valores de 60°C a 140°C . En la gráfica a) se observa cómo tanto el módulo elástico, E' , como el viscoso, E'' , disminuyen al aumentar la temperatura, lo cual es característico de un comportamiento termoplástico. (Perez et al., 2016), lo cual podría estar asociado al hecho de que se está trabajando con una mezcla de proteínas de 4 especies diferentes de microalgas. Debido a que el descenso es muy gradual, no se distingue un pico en la tangente de pérdidas, $\tan \delta$, muy definido, sino que parece abarcar un amplio intervalo de temperaturas. Así mismo se observa que a temperaturas elevadas (90°C) ambos módulos se mantienen relativamente estables, por lo que se han seleccionado como temperaturas de molde 100° , 120° , y 140°C . con objeto de obtener bioplásticos con buenas propiedades mecánicas sin que lleguen a quemarse.

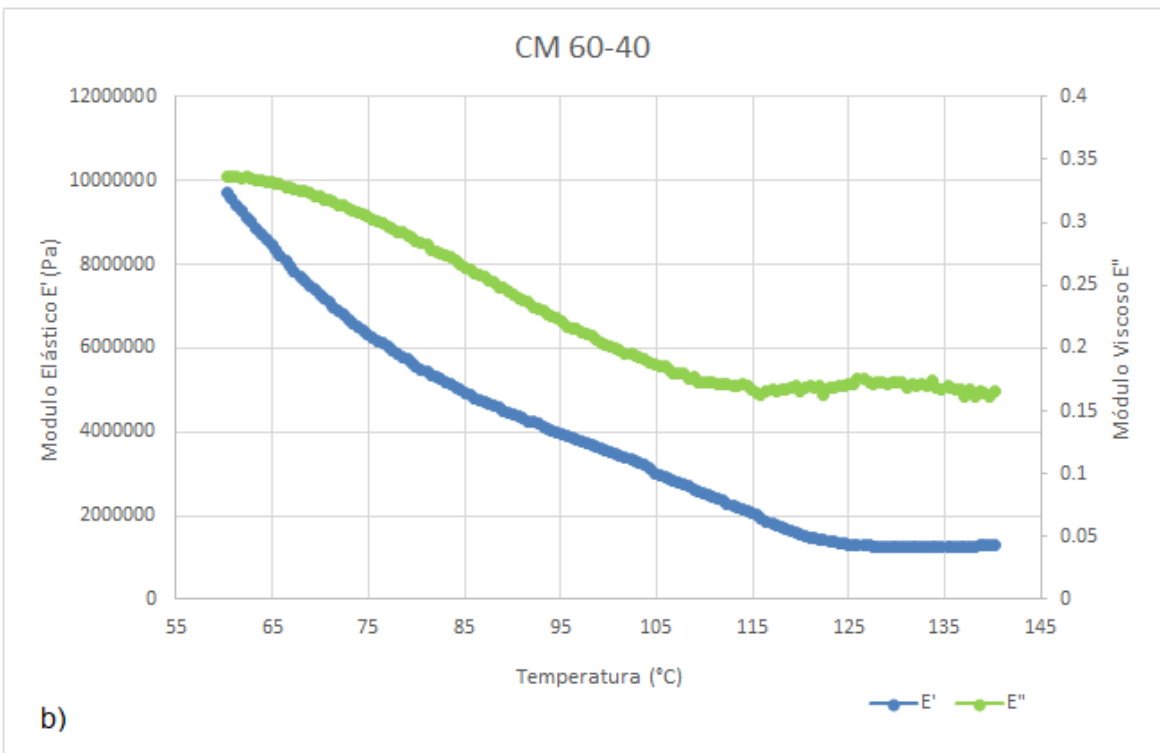
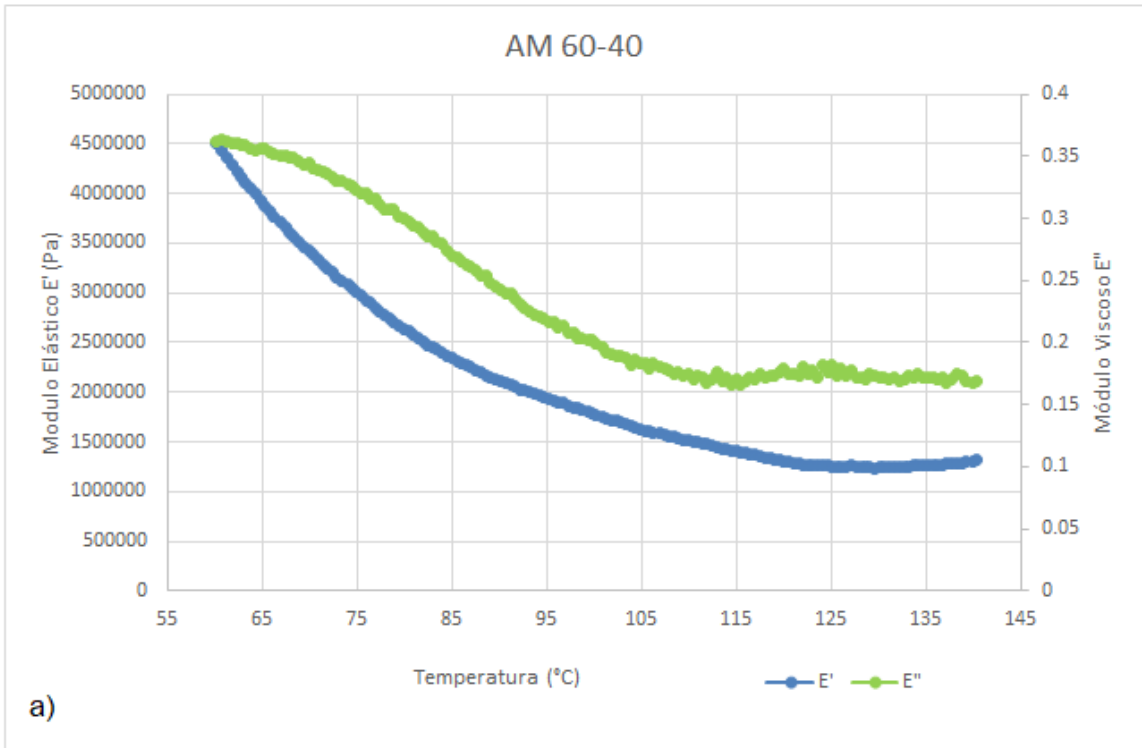


Figura 24. Gráficas para el barrido de temperatura de las muestras. A) Para la muestra comercial de *Arthrospira maxima*. B) Para la biomasa cosechada del agua residual tratada

6.7. Inyección de las muestras

Las probetas obtenidas de la máquina de inyección tuvieron las siguientes dimensiones: 1 x 10 x 60 mm de espesor, ancho y largo, respectivamente y se pueden observar en la Figura 25.



Figura 25. Probetas obtenidas del moldeo por inyección. A) Inyección de la masa en el equipo. B) Probetas obtenidas a partir de la biomasa microalgal. c) Probetas obtenidas a partir de diferentes temperaturas de moldeo

6.8. Tracción hasta rotura del bioplástico

A través de estos ensayos se determinó el módulo de Young o elástico (E), el esfuerzo máximo y la deformación máxima a la fractura.

La Figura 26 recopila las gráficas de las curvas esfuerzo-deformación que se obtuvieron para los bioplásticos procesados de la biomasa comercial AM a las tres temperaturas del molde de inyección seleccionadas. Dicho ensayo se realizó por triplicado. Todas las curvas muestran inicialmente un comportamiento elástico lineal, con una pendiente constante en la curva esfuerzo-deformación. Dichas pendientes permiten obtener los valores diferentes del Módulo de Young (E) para cada temperatura. La región del límite elástico es seguida por una etapa de deformación plástica o punto de rotura caracterizada por una disminución drástica en la pendiente de la curva esfuerzo-deformación. Se observa como tanto el módulo elástico como el esfuerzo máximo van disminuyendo al aumentar la temperatura de molde, al tiempo que se hacen más deformables. En la gráfica a) dos de los valores estuvieron estrechamente relacionados, obteniendo valores de Deformación de los 5 a los 6 MPa aproximadamente; el gráfico b) nos muestra una mayor relación entre las tres réplicas de la prueba, obteniendo valores similares a los anteriores, y finalmente en la gráfica c) los valores del esfuerzo disminuyeron. Esto puede ser debido a que el moldeo a 140° es muy agresivo para los componentes de la mezcla, por lo que se hacen más deformables con menor esfuerzo. .

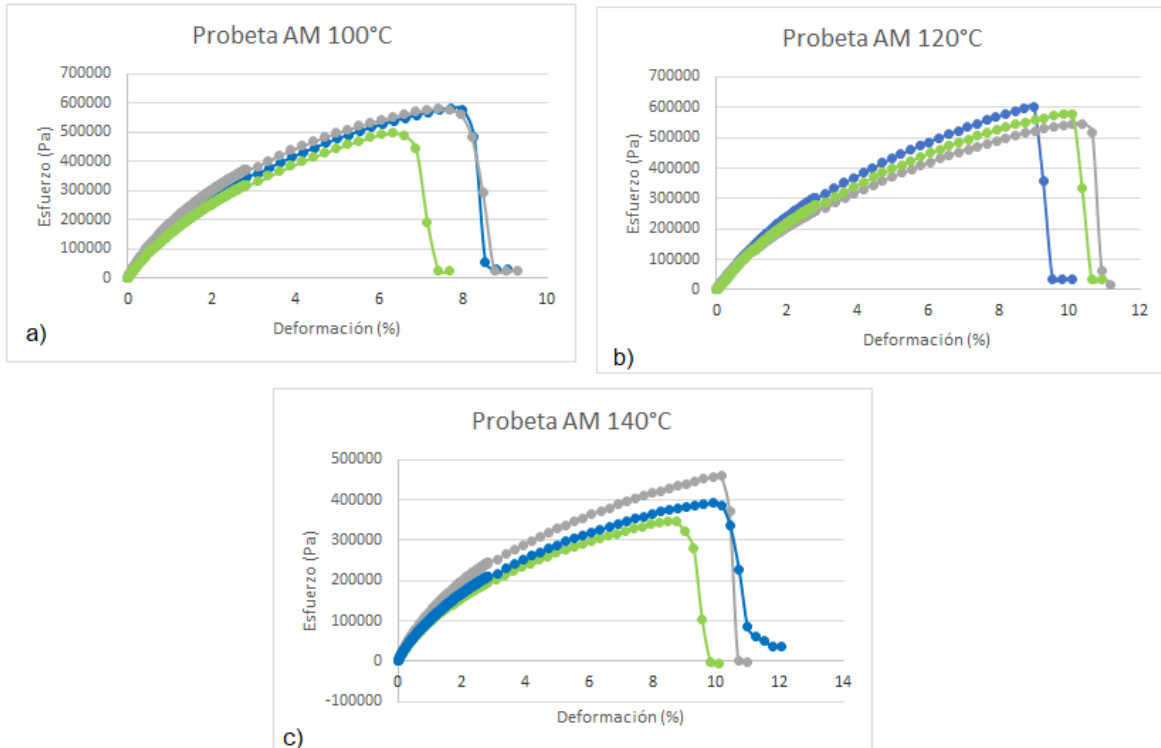


Figura 26. Gráficas de tracción hasta rotura para los bioplásticos obtenidos de la biomasa comercial

En el caso de la Figura 27, se representan las gráficas para las propiedades mecánicas de tracción para las probetas hechas con la biomasa del consorcio microalgal (CM). Se puede observar nuevamente cómo el esfuerzo disminuye al aumentar la deformación. Contrario a lo que se observa con AM, estos resultados son menores (1.8 a 4 MPa). Se puede deber a que el contenido proteínico del CM es menor al de AM. Este comportamiento es diferente al encontrado en bioplásticos basados en biomasa de soya (Fernández-Espada Ruiz, 2016) donde el contenido proteínico es mayor. Otra razón es que al tratarse de un consorcio de diferentes especies o que el tiempo de mezclado no fue suficiente para poder hacer interactuar todas las moléculas presentes.

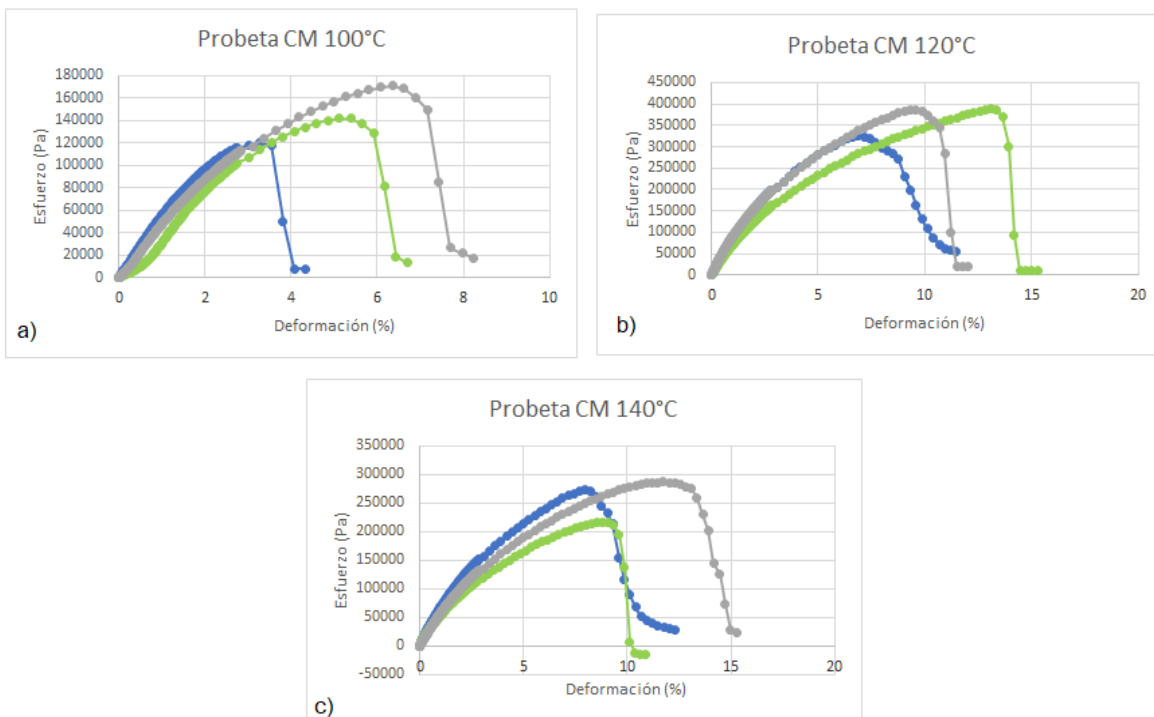


Figura 27. Gráficas de tracción hasta rotura para los bioplásticos obtenidos de la biomasa cosechada del agua residual tratada

6.9. Rampas de temperatura del bioplástico (Torsión).

La Figura 28 presenta la gráfica de la evolución de los módulos viscoelásticos y la tangente de pérdidas con la temperatura, cuando se someten las probetas a ensayos dinámicos de torsión. En las gráficas se puede observar que los valores de E' son más altos que de los de E'' y que dentro del intervalo de temperatura de 60° a 150°C se comportan de una manera muy similar, lo que parece indicar que la temperatura de molde entre 100 y 140°C no afecta en gran medida a las transiciones térmicas que puede sufrir el bioplástico. Sí es posible observar cierto aumento de los módulos, independientemente de la temperatura de molde, a 120°C aproximadamente, lo cual hace pensar que sería posible obtener materiales con mayores módulos si se llegara a procesar a temperaturas superiores. No obstante, no se pueden obviar los posibles procesos de degradación que podrían tener lugar a altas temperaturas. Al comparar los valores de $\tan \delta$ de los bioplásticos, queda patente el mayor carácter elástico de los materiales procesados por moldeo por inyección (más cercanos a 0), valor para los sólidos elásticos ideales.

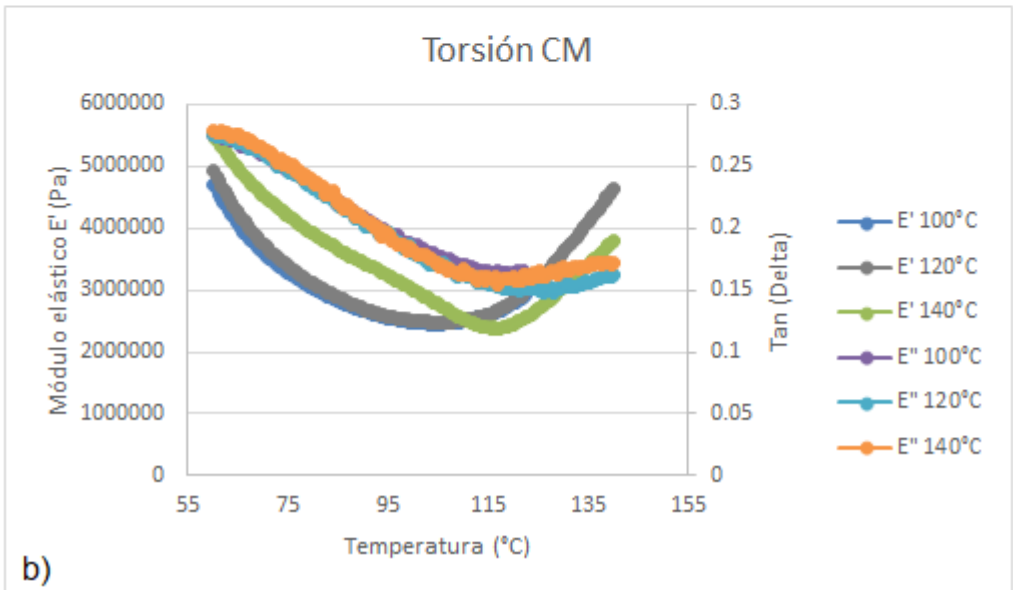
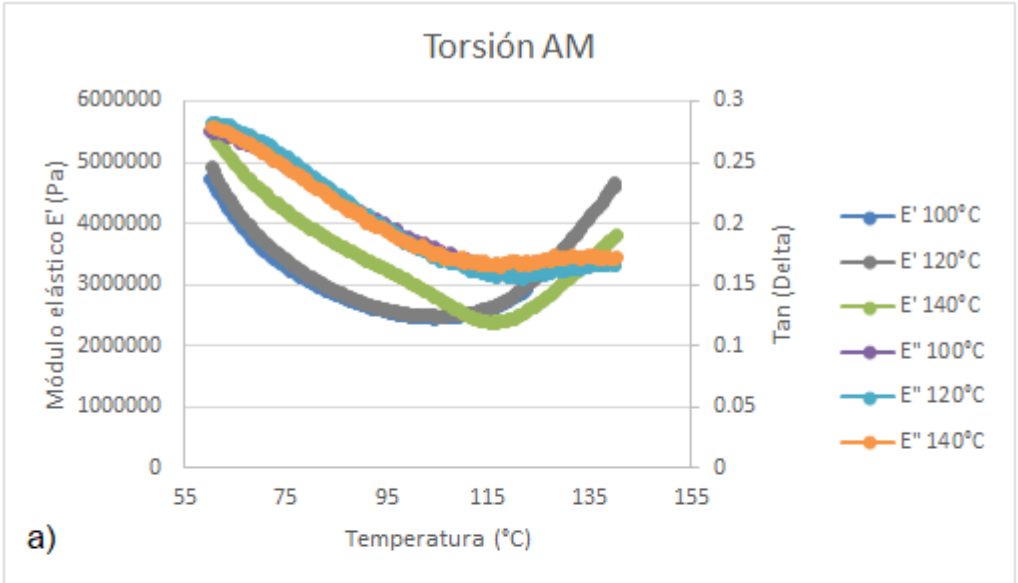


Figura 28. Gráficas de torsión de los bioplásticos. A) Para la biomasa comercial. B) Para el consorcio microalgal

6.10. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble

La Figura 29 muestra la gráfica con los valores de absorción de agua y la pérdida de material soluble obtenidos para las muestras de bioplásticos, determinados con el procedimiento descrito en la etapa experimental. A pesar de que todas las probetas absorbieron más del doble de su peso, las probetas que se moldearon a 140°C presentan la mayor capacidad de absorción (>150%), lo cual concuerda con los resultados anteriores: las probetas con menor módulo elástico, son menos rígidas, con lo que tienen mayor capacidad de hinchamiento. Por el contrario, las probetas de 100° y 120°C muestran una menor absorción, de 129% y 122% respectivamente, que se ve asociado en un módulo de elasticidad mayor que la probeta de 140°, la cual pudiera tener mayor porosidad en su estructura final debido a la pérdida de compuestos volátiles propios de los componentes de la mezcla al momento de hacer el moldeo por compresión.

La pérdida de material soluble es muy similar en los tres casos (45%), y superior a la cantidad de glicerina usada como plastificante (37.5%), lo que indica que no solo se solubiliza la glicerina, compuesto hidrófilo, sino que también se solubiliza algo de biomasa (7.5%).

Las probetas se sometieron a un proceso de inmersión y almacenamiento en estufa durante un periodo de 10 días y no se observó una variación significativa en la pérdida de material soluble ni en la absorción de agua. Esto indicaría que el material obtenido tras la primera inmersión ya ha perdido toda la biomasa que puede solubilizarse y al no perder su forma original podría ser resistente al agua.

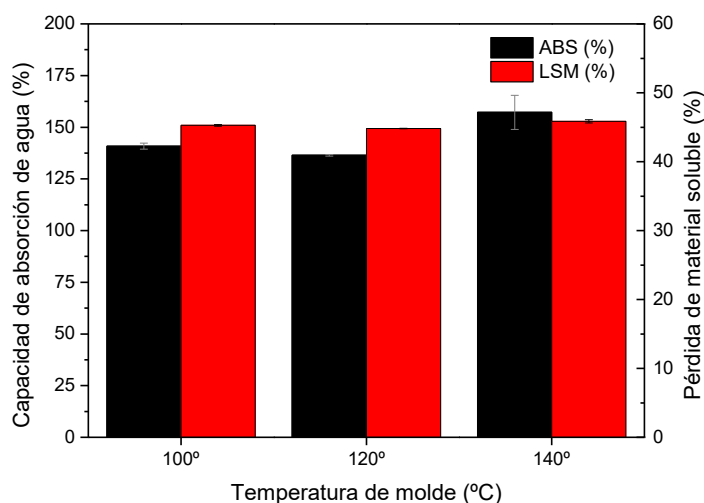


Figura 29. Resultados de la pérdida de material soluble y la absorción de agua en las probetas.

6.11. Análisis Termomecánico

El análisis termomecánico nos permite observar algunas de las temperaturas de transición vítrea (T_g) que presentan los materiales, es la temperatura a la que se da una pseudotransición termodinámica en materiales vítreos, por lo que se encuentra en vidrios, polímeros y otros materiales inorgánicos amorfos. La T_g se puede entender de forma bastante simple cuando se entiende que en esa temperatura el polímero disminuye su densidad, dureza y rigidez, además su porcentaje de elongación disminuye de forma drástica.

Se entiende que es un punto intermedio de temperatura entre el estado fundido y el estado rígido del material. El estudio de T_g es más complejo en el caso de los polímeros que en cualquier otro material de moléculas pequeñas.

Por encima de la T_g los enlaces secundarios de las moléculas son mucho más débiles que el movimiento térmico de las mismas, por ello el polímero se torna gomoso y adquiere cierta elasticidad y capacidad de deformación plástica sin fractura. Este comportamiento es específico de polímeros termoplásticos y no ocurre en polímeros termoestables. En este caso fue favorable determinar la T_g del bioplástico del CM alrededor de -58°C . La Figura 30 muestra la gráfica del análisis obtenido.

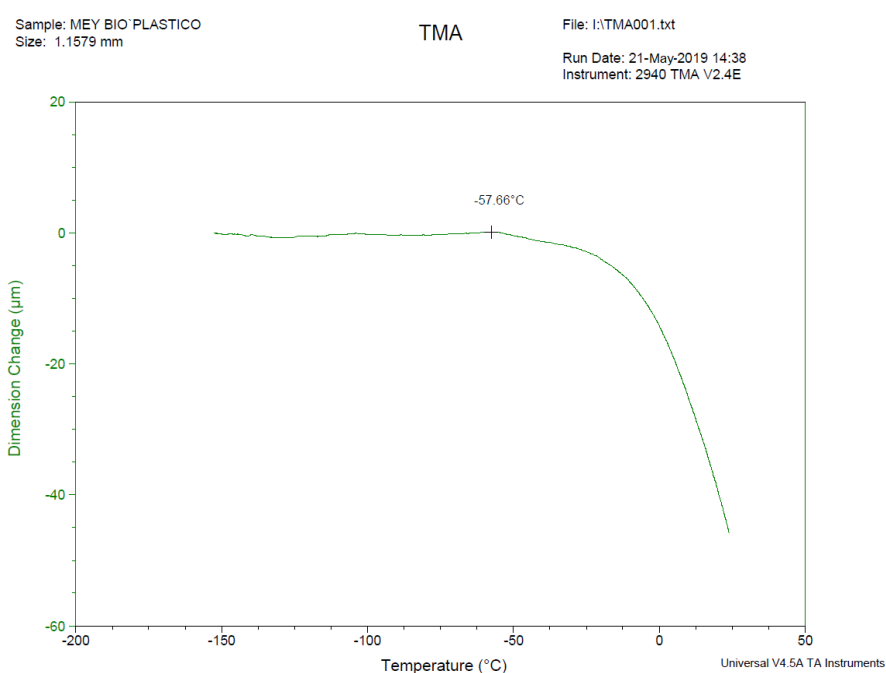


Figura 30 Gráfico del. análisis termomecánico del bioplástico de microalgas cultivadas en agua residual.

En tabla 6 podemos observar un comparativo de los valores reportados que tienen ciertos plásticos de uso común comparándolos con materiales obtenidos a partir de biomasa vegetal y de micro y macroalgas. Los valores del módulo de elasticidad obtenido para las probetas de este proyecto son mucho menores a los previamente reportados, esto es debido a que solo es una mezcla entre dos componentes, sin embargo, el valor de la capacidad de absorción de agua reportado es mayor que los demás, el cual podría ser útil dependiendo la aplicación que quiera darse.

Material	Composición	Módulo de elasticidad (MPa)	Absorción de agua (%)	Referencia
Tereftalato de polietileno (PET)	Policondensación entre el ácido tereftálico y el etilenglicol	2800	0.2	<i>ASTM INTERNATIONAL Plastic Satandars</i>
Cloruro de polivinilo (PVC)	Polimerización del cloroetileno	2400	0	<i>ASTM INTERNATIONAL Plastic Satandars</i>
Polietileno (HDPE)	Polimerización del etileno	950	0.1	<i>ASTM INTERNATIONAL Plastic Satandars</i>
Polipropileno (PP)	Polimerización del propeno	1450	0.01	<i>ASTM INTERNATIONAL Plastic Satandars</i>
Bioplástico de huevo	Albumina / glicerina	32	35	(Fernández-Espada, 2016)
Bioplástico de chícharo	Proteínas de la harina de chícharo / glicerina	50	107	(Pérez, et al. 2016)
Bioplástico de soya	Proteínas de la harina de soya / glicerina	20	195	(Álvarez, et al. 2017)
Bioplástico de harina de trigo	Gluten de trigo (comprimida a 170°C)	55	135	(Jansens et al., 2013)
Compósito de alga macroscópica	<i>Ulva armonica</i> / Alcohol polivinílico/almidón de maíz/glicerol	23	Sin reportar	(Chiellini, et al, 2008)

Mezcla de microalga con plastificante	<i>Chlorella</i> / polipropileno modificado	33	Sin reportar	(Zhang, et al, 2000)
Bioplástico de microalgas	<i>Spirulina platensis</i> / glicerol	5.7	Sin reportar	(Zeller, et al, 2013)
Bioplástico de microalgas	<i>Chlorella vulgaris</i> / glicerol	3	Sin reportar	(Zeller, et al, 2013)
Película de algas marinas	<i>Laminaria digitata</i> / glicerol	102	Sin reportar	(Blanco-Pascual, et al 2014)
Película de algas marinas	<i>Ascophyllum nodosum</i> / glicerol	6	Sin reportar	(Blanco-Pascual, et al, 2014)
Bioplastico de consorcio microalgal	Consortio de microalgas cultivada en agua residual / glicerina	4	150	Este proyecto

Tabla 6. Comparativo de los valores de Módulo de Young y de la capacidad de absorción de aguade diversos materiales

7. CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis de investigación y se concluye que es posible la obtención de un producto con características de un material bioplástico, utilizando como materia prima para la polimerización, la biomasa de un consorcio de microalgas cultivado en agua residual y glicerina como plastificante, mediante un procesamiento termomecánico de compresión y moldeo.

- Las microalgas que se identificaron en el consorcio a partir de los caracteres morfológicos corresponden a los géneros: *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Nannochloropsis* y *Arthrospira*. Se concluye que mediante el cultivo del consorcio de microalgas, se logra remover los nutrientes contenidos en el agua residual, llegando hasta un 83% del total de ortofosfatos y 98.9% nitrógeno amoniacal.
- El contenido proteínico del consorcio cultivado en el agua residual fue de 48%
- La proporción biomasa/plastificante de mayor estabilidad para el proceso de mezclado, así como la mejor temperatura para el moldeo por inyección fueron respectivamente, 60-40% y 120 °C.
- Los bioplásticos obtenidos a partir del consorcio de biomasa microalgal tienen un intervalo del módulo de Young de 2 a 4 MPa. El ensayo de torsión mostró que la mayor elasticidad se muestra en el intervalo de temperaturas de 100 a 130°C.
- La capacidad de absorción de agua del bioplástico se ve afectada por la temperatura del moldeo, observándose una retención del líquido >150% en las probetas moldeadas a 140°C.
- La temperatura de transición vítrea se determinó mediante el análisis termomecánico a los -57.66°C

Se concluye que el bioplástico obtenido presenta una alta capacidad de deformación y retención de agua, lo que lo hace apto para aplicaciones en agroindustria donde se pueda sustituir el plástico que se utiliza en forma de contenedor tipo bolsa o charolas para la germinación y crecimiento de diversas plantas ya que este material puede absorber una muy elevada cantidad de agua comparada con su peso inicial, y que por sus componentes se podría degradar en la tierra al momento de trasplantarla.

Otra posible aplicación sería en el embalaje de latas sustituyendo las anillas plásticas de PET que se utilizan de forma convencional, ya que la Tg se encuentra a una temperatura mucho menor que la que se programa en los refrigeradores para la venta de las latas de cerveza, sin embargo, se recomienda realizar pruebas de biodegradabilidad que demuestren su incorporación en el medio ambiente y así mismo mejorar sus propiedades mecánicas de resistencia mediante la adición de otro tipo de materiales plastificantes, tanto naturales como sintéticos.

8. REFERENCIAS:

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Albayrak, C., & Swartz, J. R. (2014). Direct polymerization of proteins. *ACS Synthetic Biology*, 3(6), 353–362. <https://doi.org/10.1021/sb400116x>
- Angulo Mercado, E., Castellar Ortega, G., Morales Avendaño Ever, & Barrios Solano Merly. (2012). Remoción De Azul De Metileno Por La Microalga *Chlorella Sp. Viva*. *Prospect*, 10(1), 53–60.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., & Perales, J. A. (2013). Photobiotreatment: Influence of Nitrogen and Phosphorus Ratio in Wastewater on Growth Kinetics of *Scenedesmus Obliquus*. *International Journal of Phytoremediation*, 15(8), 774–788. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.735291>
- Balaji, S., Gopi, K., & Muthuvelan, B. (2013). A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Research*, 2(3), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.03.002>
- Barka, A., & Blecker, C. (2016). Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 20(3), 427–436.
- Becker, Edward., & Kumar, S. (2015). Microalgae as a source of nutraceuticals. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry: Second Edition*, 25, 255–291. <https://doi.org/10.1002/9781118500354.ch12>
- Beuckels, A., Smolders, E., & Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, 77, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Bier, J. M., Verbeek, C. J. R., & Lay, M. C. (2014). Thermal transitions and structural relaxations in protein-based thermoplastics. *Macromolecular Materials and Engineering*, 299(5), 524–539. <https://doi.org/10.1002/mame.201300248>
- BIO-PLASTIC POTENTIAL OF SPIRULINA MICROALGAE by KUN WANG (Under the Direction of Suraj Sharma). (2014).
- Bourtoom, T. (2009). Edible protein films: Properties enhancement. *International Food Research Journal*, 16(1), 1–9.
- Caporgno, M. P., Taleb, A., Olkiewicz, M., Font, J., Pruvost, J., Legrand, J., & Bengoa, C. (2015). Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. *Algal Research*, 10, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.011>
- Cheng, Y. L., Juang, Y. C., Liao, G. Y., Tsai, P. W., Ho, S. H., Yeh, K. L., ... Lee,

- D. J. (2011). Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation. *Bioresource Technology*, 102(1), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.083>
- Cho, S., Lee, N., Park, S., Yu, J., Luong, T. T., Oh, Y.-K., & Lee, T. (2013). Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. *Bioresource Technology*, 131, 515–520. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.176>
- Chronakis, I. S., & Madsen, M. (2011). *Algal proteins. Handbook of Food Proteins*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-758-7.50014-9>
- Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1997). Thermoplastic properties of fish myofibrillar proteins: Application to biopackaging fabrication. *Polymer*, 38(16), 4071–4078. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(96\)01011-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(96)01011-7)
- De Graaf, L. A. (2000). Denaturation of proteins from a non-food perspective. *Journal of Biotechnology*, 79(3), 299–306. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00245-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00245-5)
- DiGregorio, B. E. (2009). Biobased Performance Bioplastic: Mirel. *Chemistry and Biology*, 16(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.01.001>
- Espinoza Escalante, M. (2017). Microalgas en la alimentación. ¿Suplementos novedosos o reinventados? *CIENCIA. Comunicaciones Libres*, 68, 1–5.
- Felix, M., Romero, A., Cordobes, F., & Guerrero, A. (2014). Development of crayfish bio-based plastic materials processed by small-scale injection moulding. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(4), 679–687. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6747>
- Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F., & Guerrero, A. (2016). Protein/glycerol blends and injection-molded bioplastic matrices: Soybean versus egg albumen. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(6). <https://doi.org/10.1002/app.42980>
- Fernández-Espada Ruiz, L. (2016). Desarrollo de materiales bioplásticos proteicos con elevada capacidad de absorción de agua. *Tesis Doctoral. Departamento De Ingeniería Química. Universidad de Sevilla*, 304.
- Figueroa-Torres, M. G., Arana-Magallón, F., Almanza-Encarnación, S., Ferrara-Guerrero, M. J., & Ramos-Espinosa, M. G. (2015). Microalgas del Área Natural Protegida Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco, México. *CienciaUAT*, 9(2), 15. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v9i2.713>
- Gall, S. C., & Thompson, R. C. (2015). The impact of debris on marine life. *Marine Pollution Bulletin*, 92(1–2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.041>
- García Estrada, R. (2014). *Separación de microalgas presentes en agua residual tratada del lago Nabor Carrillo mediante ozoflotación*. Facultad de Ingeniería,

Universidad Nacional Autónoma de México.

- Gheribi, R., Puchot, L., Verge, P., Jaoued-Grayaa, N., Mezni, M., Habibi, Y., & Khwaldia, K. (2018). Development of plasticized edible films from *Opuntia ficus-indica* mucilage: A comparative study of various polyol plasticizers. *Carbohydrate Polymers*, *190*, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.085>
- Gómez-Martínez, D., Partal, P., Martínez, I., & Gallegos, C. (2009). Rheological behaviour and physical properties of controlled-release gluten-based bioplastics. *Bioresource Technology*, *100*(5), 1828–1832. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.016>
- Gómez Martínez, D. P. (2013). *Desarrollo de bioplásticos a partir de subproductos agroalimentarios con aplicaciones en envases y matrices de difusión. Universidad de Huelva, Departamento De Ingeniería Física, Química.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Góngora, J. (2014). La industria del plástico en México y el mundo. *Comercio Exterior*, *64*(5), 6–9. Retrieved from http://revistas.bancomext.gob.mx/rce/magazines/761/3/la_industria_del_plastico.pdf
- Gouveia, L., Graça, S., Sousa, C., Ambrosano, L., Ribeiro, B., Botrel, E. P., ... Silva, C. M. (2016). Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs. Scale-up considerations. *Algal Research*, *16*, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.010>
- Hempel, F., Bozarth, A. S., Lindenkamp, N., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., ... Maier, U. G. (2011). Microalgae as bioreactors for bioplastic production. *Microbial Cell Factories*, *10*(1), 81. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-81>
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *49*(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Jabeen, N., Majid, I., & Nayik, G. A. (2015). Bioplastics and food packaging: A review. *Cogent Food & Agriculture*, *1*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1117749>
- Jansens, K. J. A., Vo Hong, N., Telen, L., Brijs, K., Lagrain, B., Van Vuure, A. W., ... Delcour, J. A. (2013). Effect of molding conditions and moisture content on the mechanical properties of compression molded glassy, wheat gluten bioplastics. *Industrial Crops and Products*, *44*, 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.006>
- Jerez, A., Partal, P., Martínez, I., Gallegos, C., & Guerrero, A. (2007). Protein-based bioplastics: Effect of thermo-mechanical processing. *Rheologica Acta*, *46*(5), 711–720. <https://doi.org/10.1007/s00397-007-0165-z>
- Ji, F., Liu, Y., Hao, R., Li, G., Zhou, Y., & Dong, R. (2014). Biomass production and

- nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresource Technology*, 161, 200–207.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.034>
- Ji, M.-K., Yun, H.-S., Park, Y.-T., Kabra, A. N., Oh, I.-H., & Choi, J. (2015). Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO₂ for biomass production. *Journal of Environmental Management*, 159, 115–120.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.05.037>
- Jones, A., Mandal, A., & Sharma, S. (2015). Protein-based bioplastics and their antibacterial potential. *Journal of Applied Polymer Science*.
<https://doi.org/10.1002/app.41931>
- Kale, G., Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Selke, S. E., & Singh, S. P. (2007). Compostability of bioplastic packaging materials: An overview. *Macromolecular Bioscience*, 7(3), 255–277.
<https://doi.org/10.1002/mabi.200600168>
- Kamiya, N., Doi, S., Tominaga, J., Ichinose, H., & Goto, M. (2005). Transglutaminase-mediated protein immobilization to casein nanolayers created on a plastic surface. *Biomacromolecules*, 6(1), 35–38.
<https://doi.org/10.1021/bm0494895>
- Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 321–326.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>
- Komolafe, O., Velasquez Orta, S. B., Monje-Ramirez, I., Noguez, I. Y., Harvey, A. P., & Orta Ledesma, M. T. (2014). Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresource Technology*, 154, 297–304.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.048>
- Lambert, S., & Wagner, M. (2017). Environmental performance of bio-based and biodegradable plastics: the road ahead. *Chem. Soc. Rev.*, 46(August), 6855–6871. <https://doi.org/10.1039/C7CS00149E>
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1–46.
<https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00040-7)
- Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1532–1542.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>

- Martín, N., & Arribas Arribas, C. (2012). *Ciencia de materiales para ingenieros*. Pearson Educación. Retrieved from <https://pearson.es/españa/TiendaOnline/ciencia-de-materiales-para-ingenieros>
- Martínez, I., Partal, P., García-Morales, M., Guerrero, A., & Gallegos, C. (2013). Development of protein-based bioplastics with antimicrobial activity by thermo-mechanical processing. *Journal of Food Engineering*, 117(2), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.014>
- Masojídek, J., & Torzillo, G. (2014). Mass Cultivation of Freshwater Microalgae☆. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, 2226–2235. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09373-8>
- Matveev, Y. I., Grinberg, V. Y., & Tolstoguzov, V. B. (2000). The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds. *Food Hydrocolloids*, 14(5), 425–437. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00020-5)
- Mayers, J. J., Flynn, K. J., & Shields, R. J. (2014). Influence of the N: P supply ratio on biomass productivity and time-resolved changes in elemental and bulk biochemical composition of *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 169(May 2016), 588–595. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.048>
- Mekonnen, T., Mussone, P., Khalil, H., & Bressler, D. (2013). Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(43). <https://doi.org/10.1039/c3ta12555f>
- Méndez, G. B., & Monroy, C. C. (2009). Producción de hidrógeno a partir de aguas residuales. *Unam.Mx Revista Digital Universitaria*, 10(8).
- Molina, E., Martínez, E., Sánchez, S., García, F., & Contreras, A. (1991). The influence of temperature and the initial N:P ratio on the growth of microalgae *Tetraselmis* sp. *Process Biochemistry*, 26(3), 183–187. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(91\)80016-l](https://doi.org/10.1016/0032-9592(91)80016-l)
- Muñoz, R., Malhautier, L., Fanlo, J. L., & Quijano, G. (2015). Biological technologies for the treatment of atmospheric pollutants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95(10), 950–967. <https://doi.org/10.1080/03067319.2015.1055471>
- Olivares, R. (2010). Producción de Aceite para usos industriales a partir de la microalga “*Scenedesmus obliquus*”, 118.
- Pacheco Flores, G. (2014). Bioplásticos. *BioTecnología*, 18(2), 27–36.
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>
- Perez, V., Felix, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2016). Characterization of pea protein-based bioplastics processed by injection moulding. *Food and*

- Bioproducts Processing*, 97, 100–108.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.12.004>
- Philp, J. C., Bartsev, A., Ritchie, R. J., Baucher, M. A., & Guy, K. (2013). Bioplastics science from a policy vantage point. *New Biotechnology*, 30(6), 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.021>
- Pommet, M., Redl, A., Morel, M. H., Domenek, S., & Guilbert, S. (2003). Thermoplastic processing of protein-based bioplastics: Chemical engineering aspects of mixing, extrusion and hot molding. *Macromolecular Symposia*, 197, 207–217. <https://doi.org/10.1002/masy.200350719>
- Pouplin, M., Redl, A., & Gontard, N. (1999). Glass transition of wheat gluten plasticized with water, glycerol, or sorbitol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 538–543. <https://doi.org/10.1021/jf980697w>
- Rai, H. S., Bhattacharyya, M. S., Singh, J., Bansal, T. K., Vats, P., & Banerjee, U. C. (2005). Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: A review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35(3), 219–238. <https://doi.org/10.1080/10643380590917932>
- Rasdi, N. W., & Qin, J. G. (2015). Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. *Journal of Applied Phycology*, 27(6), 2221–2230. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0495-z>
- Razo, C., Ludeña, C., Saucedo, A., Astete-Miller, S., Hepp, J., & Vildósola, A. (2007). *Producción de biomasa para biocombustibles líquidos: el potencial de América latina y el Caribe*. (C. Razo, C. Ludeña, A. Saucedo, S. Astete-Miller, & J. Hepp, Eds.). Santiago de Chile: Naciones Unidas, CEPAL, Unidad de Desarrollo Agrícola, Div. de Desarrollo Productivo y Empresarial. Retrieved from http://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/4581/S0700830_es.pdf?sequence=1
- Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K., & Mohanty, A. K. (2013). Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1653–1689. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006>
- Rhee, G.-Y. (1978). Effects of N : P Atomic Ratios and Nitrate Limitation on Algal Growth , Cell Composition , and Nitrate Uptake. *Limnology and Oceanography*, 23(1), 10–25. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2835687>
- Round, F. E. (1971). The taxonomy of the chlorophyta. II. *British Phycological Journal*, 6(2), 235–264. <https://doi.org/10.1080/00071617100650261>
- Samorì, G., Samorì, C., Guerrini, F., & Pistocchi, R. (2013). Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae

- consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. *Water Research*, 47(2), 791–801.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.006>
- Sathish, A., Glaittli, K., Sims, R. C., & Miller, C. D. (2014). Algae Biomass Based Media for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production by *Escherichia coli*. *Journal of Polymers and the Environment*, 22(2), 272–277.
<https://doi.org/10.1007/s10924-014-0647-x>
- Shi, B., Wideman, G., & Wang, J. H. (2012). A New Approach of BioCO₂ Fixation by Thermoplastic Processing of Microalgae. *Journal of Polymers and the Environment*, 20(1), 124–131. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0329-x>
- Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742.
<https://doi.org/10.3390/ijms10093722>
- Umamaheswari, J., & Shanthakumar, S. (2016). Efficacy of microalgae for industrial wastewater treatment: a review on operating conditions, treatment efficiency and biomass productivity. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 15(2), 265–284. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9397-7>
- Valeriano González, M. T., Monje-Ramírez, I., Orta Ledesma, M. T., Gracia Fadrique, J., & Velásquez-Orta, S. B. (2016). Harvesting microalgae using ozoflotation releases surfactant proteins, facilitates biomass recovery and lipid extraction. *Biomass and Bioenergy*, 95, 109–115.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.09.020>
- Wu, Y. H., Yu, Y., & Hu, H. Y. (2015). Microalgal growth with intracellular phosphorus for achieving high biomass growth rate and high lipid/triacylglycerol content simultaneously. *Bioresource Technology*, 192, 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.057>
- Xin, L., Hong-ying, H., & Jia, Y. (2010). Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnology*, 27(1), 59–63.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.11.006>
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101(14), 5494–5500.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
- Younes, B. (2017). Classification, characterization, and the production processes of biopolymers used in the textiles industry. *Journal of the Textile Institute*, 108(5), 674–682. <https://doi.org/10.1080/00405000.2016.1180731>
- Zeller, M. A., Hunt, R., Jones, A., & Sharma, S. (2013). Bioplastics and their thermoplastic blends from *Spirulina* and *Chlorella* microalgae. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(5), 3263–3275.

<https://doi.org/10.1002/app.39559>

- Zhang, C., Zhang, Y., Zhuang, B., & Zhou, X. (2014). Strategic enhancement of algal biomass, nutrient uptake and lipid through statistical optimization of nutrient supplementation in coupling *Scenedesmus obliquus*-like microalgae cultivation and municipal wastewater treatment. *Bioresource Technology*, *171*, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.060>
- Zhang, E., Wang, B., Wang, Q., Zhang, S., & Zhao, B. (2008). Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Bioresource Technology*, *99*(9), 3787–3793. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.011>
- Zhang, F., Endo, T., Kitagawa, R., Kabeya, H., & Hirotsu, T. (2000). Synthesis and characterization of a novel blend of polypropylene with *Chlorella*. *Journal of Materials Chemistry*, *10*(12), 2666–2672. <https://doi.org/10.1039/b004489j>
- ZHU, J., RONG, J., & ZONG, B. (2013). Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Catalysis*, *34*(1), 80–100. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(11\)60497-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(11)60497-X)

9. AGRADECIMIENTOS

Como parte de este proceso de aprendizaje para mi vida académica quiero agradecer a Dios por poner en mi camino a múltiples personas que fueron, son y serán una gran inspiración, motivación y ejemplo de vida.

Primeramente, a mi tutora principal, la Dra. María Teresa Orta Ledesma por confiarme este proyecto desde la primera entrevista que tuvimos. Al Dr. Ignacio Monje Ramírez por aportarme siempre con la mejor actitud diversas observaciones que enriquecieron este trabajo. A la Dra. Mirna Estrada Yáñez por la paciencia y los consejos otorgados para la realización e interpretación del material obtenido. Al Dr. Armando González Sánchez y al Dr. Alejandro Vargas Casillas por sus aportaciones puntuales en el escrito de tesis. A la maestra Isaura Yáñez Noguez por todo el apoyo brindado tanto para los trámites del instituto como para el proyecto. A mis profesores, la Dra. Catalina Ferat y Gabriela Moeller por el aprendizaje obtenido, al Dr. Alfonso Durán por aterrizarme en las clases y aconsejarme para lograr el proyecto. A la Dra. Ana Elisa Silva y el Dr. Eduardo Vega por toda la motivación, el conocimiento compartido, por confiar en mí y mis capacidades, por ser un ejemplo de vida tanto académica como personal y por demostrarme que el amor en pareja dura muchísimos años.

A todo el personal del Instituto de Ingeniería, en especial a la Ing. Cristina Araoz por recibirme siempre con una sonrisa y orientarme en todos los procesos internos del posgrado. A Gustavo Rodríguez Van Lier por la ayuda con los trámites y los consejos otorgados. A la Dra. Susana Saval Bohorquez por las facilidades dadas. Al Dr. Daniel de los Cobos por las capacitaciones que me dio. Al ing. Roberto Briones por la ayuda con los trámites y los procesos del Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA), así mismo agradecerle todo el apoyo brindado por el personal del LIA.

Al Dr. Antonio Guerrero y al Dr. Carlos Bengoechea por recibirme en la Universidad de Sevilla sin conocernos previamente y confiar en mí y en el proyecto, por todo el apoyo brindado para la obtención del material y la interpretación de los resultados. A la maestra Estefanía Álvarez por su apoyo con los equipos y por toda su paciencia durante mi estancia en Sevilla, por las risas, las aventuras y por ser la mejor guía andaluza.

A mis compañeros del cubículo 410, por todas las risas, anécdotas, experiencias y trabajo en equipo. A Tere Valeriano y Andrea Hernández por sus continuos consejos y recomendaciones. A Isaac Nava, Erick Vielma y Karina Atengueño por todas las pláticas académicas que enriquecen nuestros trabajos. A mis compañeros de generación, Enrique Romero, Ximena Gutiérrez, Melisa Portilla, Hiram Guerrero, Andrea Rodríguez e Itzel Rolón por el compañerismo y la amistad adquirida, por las pláticas, los trabajos y las desveladas.

A toda mi familia por estar siempre pendiente de mí, a mis mamás: MamáTina, Lulú, Concha, Paquita, Juanis y Maira, a mi abuelo Marcelino y a mis tíos José Luis y Carlos, a todos por su apoyo incondicional. A mis hermanos Gerardo y Jany por la paciencia de tenerme como pariente. A mi ejemplo de vida Paty Rocha por ser el motor que me impulsa y motiva día a día para salir adelante, por todos sus regaños y consejos, por darme la vida, por creer y confiar en mí y mis locuras, por todo su amor de madre y porque sin ella yo no podría haber llegado hasta este punto. Si se pudo mami, te amo.

A mis amigos de la vida; a Jess Celestino por aconsejarme a revisar los proyectos del Instituto de Ingeniería y motivarme a desarrollarme académicamente. A Andrés Meaney por estar en contacto conmigo desde el primer año de la licenciatura que compartimos y aportarme ideas y consejos. A Fadia Domínguez por ser una inspiración desde que nos conocimos en la UAM, por las pláticas fuera de lo normal, las risas eternas y por toda su ayuda para facilitar mi estancia en España. A Alberto Garnica por todo el apoyo que me ha brindado como mi compañero de vida, sus regaños y cariños, su compañía en la escritura de este proyecto y por todo el amor que me demuestra día a día. A Adriana Barrientos por creer en mí desde el momento en que nos conocimos y aconsejarme en todo, por ser mi confidente, mi hermana y mi cómplice.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado en el periodo de realización de este trabajo, especialmente a Susana Ramírez por todo su apoyo con los trámites.

Por mi raza hablará el espíritu.

César Javier López Rocha