



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

Disrupción de microalgas por ultrasonido y ozono para incrementar la  
recuperación de biocomponentes valorizables

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

PRESENTA:  
M.C.Q. Regina de Monserrat González Balderas

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. María Teresa Orta Ledesma, Instituto de Ingeniería-UNAM  
COMITÉ TUTOR  
Dr. Alfredo Maciel Cerda, Instituto de Investigación en Materiales-UNAM  
Dra. Idania Valdez Vázquez, Instituto de Ingeniería-UNAM  
Dr. Armando González Sánchez, Instituto de Ingeniería-UNAM  
Dr. Domínguez Bocanegra Alma Rosa, Cinvestav

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. (FEBRERO) 2020



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. Maciel Cerda Alfredo

Secretario: Dra. Valdéz Vázquez Idania

1er. Vocal: Dr. González Sánchez Armando

2do. Vocal: Domínguez Bocanegra Alma Rosa

3er Vocal: Dra. Orta Ledesma María Teresa

Lugar donde se realizó la tesis

Instituto de Ingeniería de la UNAM.

Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM

**Dra. María Teresa Orta Ledesma**

NOMBRE

---

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**



## *Agradecimientos*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (número de beca: 385966/253075) otorgada durante los estudios de doctorado.

Al Fondo Sectorial CONACYT-SENER-Sustentabilidad Energética (proyecto 220704) por los fondos recibidos durante la estancia de investigación en la Universidad de Newcastle (Sep-Nov 2017).

Al banco Santander por la beca Jóvenes Profesores Investigadores otorgada durante la estancia de investigación en la Universidad de Sevilla, España (Abril-Agosto, 2019).

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

A la Dra. Sharon Velásquez-Orta por todo su apoyo durante la estancia de investigación en la Universidad de Newcastle y los artículos publicados.

A la M. en C. Isaura Yañez Noguez por todo el apoyo brindado en el trabajo de laboratorio durante el desarrollo del proyecto de investigación.

A Dr. Ignacio Monje Ramírez por todo el apoyo brindado en el trabajo de ozonación durante el desarrollo del proyecto de investigación.

Al Dr. Jorge Herrera de la USAII por todo su apoyo en la electroforesis e identificación de proteínas.

A la Dra. Idania Valdez Vázquez y el Jesús Gracia Fadrique por ser parte del comité tutorial y por todas sus aportaciones al trabajo de investigación.

Al Dr. Antonio Conejo, Dr. Manuel Félix y al Dr. Carlos Bengoechea por todo su apoyo en la estancia de investigación en la Universidad de Sevilla, España.

A la Dra. Alma Rosa Domínguez Bocanegra, el Dr. Alfredo Maciel Cerda y el Dr. Armando González Sánchez por sus valiosas aportaciones al trabajo de tesis.

A mis compañeros que fueron parte del proyecto “ATZINTLI” porque sin sus aportaciones al proyecto no hubiera podido concluir el trabajo de investigación.

A mis compañeros de trabajo por todas las experiencias vividas y el apoyo que todos aportamos, que es lo que nos hace formar un gran equipo de trabajo.

## *Dedicatoria*

A mi esposo Juan de la Cruz, por todo su apoyo y por estar dispuesto siempre a dar lo mejor de los dos en todo lo que hacemos.

A mis padres Virginia y Jorge, por todo su apoyo siempre. Este logro también es de ustedes, no creo encontrar la forma de agradecerles todo lo que hacen por mí.

A mis hermanas Laura, Ana, Alejandra e Irais por su apoyo incondicional y ser mis mejores amigas.

A mi sobrina Ana Pau por ser la luz que trajo la más grande alegría a nuestra familia.

A mis abuelos Carolina y Antonio, por siempre estar con nosotros y darnos todo su apoyo.

A mi familia en general porque a pesar de que no nos vemos tan seguido sé que cuento con todo su apoyo.

A mi tía Coco porque su triste partida vino a enseñarnos a todos a amar más la vida y atesorar las cosas que valen la pena.

A todas las personas que de alguna manera tuvieron que ver con este trabajo de investigación.

*“Gracias... “*

ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Marco teórico</b> .....	<b>10</b>
3.1 Microalgas.....	11
3.1.1 Composición bioquímica y estructura de las microalgas.....	11
3.1.1.1 Pared celular.....	13
3.1.1.2 Lípidos .....	13
3.1.1.3 Proteínas.....	13
3.1.1.4 Carbohidratos .....	14
3.2 Ficorremediación.....	14
3.3 Bioenergía a partir de microalgas.....	16
3.4 Biorrefinería .....	17
3.5 Biorrefinería de microalgas .....	18
3.5.1 Cosecha .....	19
3.5.2 Pretratamientos .....	20
3.5.2.1 Métodos de disrupción celular mecánicos .....	21
3.5.2.2 Métodos de disrupción celular no mecánicos .....	21
3.5.2.3 Ultrasonido.....	21
3.5.2.4 Efecto del ultrasonido en microorganismos.....	22
3.5.2.5 Pretratamiento de biomasa microalgal con ultrasonido .....	22
3.5.2.6 Ozono.....	23
3.5.2.7 Pretratamiento de biomasa microalgal con ozono .....	23
3.5.3 Fraccionación de biocomponentes microalgales .....	25
3.5.3.1 Extracción de lípidos.....	25
3.5.3.2 Extracción de proteínas.....	25
3.5.3.3 Sacarificación de carbohidratos .....	26
3.6 Valorización de proteínas .....	26
3.6.1 Productos y propiedades de proteínas microalgales .....	28
3.6.2 Obtención de bioplásticos con base en proteínas.....	29
3.6.3 Obtención de bioplásticos a partir de un proceso termoplástico.....	29

## Índice

---

3.6.3.1	Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).....	30
3.6.3.2	Desnaturalización y temperatura de fusión.....	31
3.6.3.3	Agregación.....	32
3.6.3.4	Degradación.....	32
3.6.4	Plastificante.....	33
3.6.5	Moldeado por inyección.....	35
3.6.5.1	Etapas de extrusión o mezclado.....	36
3.6.5.2	Etapas de moldeo por inyección.....	36
3.6.5.3	Temperatura de la unidad de inyección.....	37
3.6.5.4	Velocidad de inyección.....	37
3.6.5.5	Tiempo de inyección.....	37
3.6.5.6	Presión de inyección.....	38
3.6.5.7	Temperatura de molde.....	38
3.6.6	Biocompositos.....	38
3.6.7	Propiedades del material obtenido.....	39
3.6.7.1	Solubilidad.....	39
3.6.7.2	Absorción de agua.....	40
3.6.7.3	Propiedades mecánicas.....	40
3.7	Electrohilado.....	41
3.7.1	Parámetros asociados a la solución de proteína.....	42
3.7.1.1	Viscosidad.....	43
3.7.1.2	Conductividad.....	43
3.7.1.3	Constante dieléctrica.....	43
3.7.1.4	Tensión superficial.....	43
3.7.1.5	Elección de solvente.....	44
3.7.1.6	Elección de polímeros.....	44
3.7.2	Parámetros asociados al procesamiento.....	44
3.7.2.1	Fuerza del campo eléctrico.....	44
3.7.2.2	Colectores.....	45
3.7.2.3	Distancia.....	45
3.7.2.4	Caudal.....	45



## Índice

---

3.7.2.5 Aguja.....	46
3.7.3 Parámetros ambientales .....	46
3.7.3.1 Humedad.....	46
3.7.3.2 Temperatura .....	47
3.7.3.3 Composición y movimiento del gas ambiental.....	47
3.7.4 Materiales.....	48
3.7.5 Aplicaciones.....	48
3.7.5.1 Filtros y textiles.....	48
3.7.5.2 Aplicaciones médicas (administración de fármacos e ingeniería de tejidos) .....	48
3.7.5.3 Compositos y plantillas.....	49
3.7.5.4 Otros.....	50
3.8 Recuperación del fósforo contenido en biomasa de microalgas .....	50
3.8.1 Usos del fósforo .....	52
3.8.1.1 Fertilizantes.....	52
3.8.1.2 Detergentes .....	52
3.8.1.3 Otros usos del fósforo .....	52
3.8.2 Fósforo en la industria alimentaria .....	53
3.8.3 Fósforo en aguas residuales .....	53
3.8.4 Recuperación de fósforo de aguas residuales .....	54
3.8.5 Fósforo en microalgas.....	54
3.8.6 Métodos de recuperación de fósforo.....	56
<b>4. Metodología experimental.....</b>	<b>57</b>
4.1 Muestras de microalga.....	59
4.2 Cultivo de microalgas.....	59
4.3 Pretratamiento de biomasa de microalgas y extracción en tándem de biocomponentes.....	60
4.3.1 Diseño de experimentos.....	60
4.3.2 Pretratamiento con ultrasonido u ozono .....	61
4.3.3 Cuantificación de los componentes liberados a la fase acuosa.....	61
4.3.4 Extracción de los biocomponentes microalgales residuales .....	62
4.3.4.1 Extracción y cuantificación de lípidos.....	62
4.3.4.2 Extracción y cuantificación de proteínas .....	62
4.3.4.3 Hidrólisis y cuantificación de carbohidratos.....	62
4.3.5 Análisis de la composición de los lípidos recuperados.....	62

4.4 Efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono en la fracción proteica de la biomasa de microalgas .....	63
4.4.1 Extracción de proteínas con fenol para SDS-PAGE de la biomasa pretratada .....	63
4.4.2 Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	63
4.4.3 Identificación de proteínas presentes en la biomasa de los consocios D y S .....	64
4.4.4 Extracción de proteínas para su caracterización térmica por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y obtención de membranas de nanofibras de electrohilado .....	64
4.4.5 Solubilidad de proteínas .....	65
4.4.6 Concentración de grupos disulfuro y sulfhidrilo .....	65
4.4.7 Identificación térmica de proteínas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	65
4.5 Obtención de bioplásticos con base en biomasa de los consocios D y S .....	65
4.5.1 Preparación de bioplásticos .....	65
4.5.1.1 Reología de la mezcla biomasa plastificante .....	66
4.6 Obtención de biocompositos con base en biomasa residual de los consorcios D y S .....	66
4.6.1 Caracterización de la biomasa residual .....	66
4.6.1.1 Contenido de cenizas .....	66
4.6.1.2 Contenido de humedad .....	66
4.6.1.3 Contenido de lípidos .....	66
4.6.1.4 Contenido de proteínas .....	67
4.6.1.5 Contenido de carbohidratos .....	67
4.6.2 Preparación de biocompositos .....	67
4.6.2.1 Análisis térmico mecánico dinámico (DMTA) de las mezclas biomasa/glicerol/PCL .....	67
4.7 Caracterización de los materiales obtenidos .....	67
4.7.1 Análisis mecánico dinámico (DMA) .....	67
4.7.2 Pruebas de tracción .....	67
4.7.3 Capacidad de absorción de agua .....	68
4.8 Obtención de membranas de nanofibras por electrohilado a partir de proteínas de biomasa de microalgas del consorcio D pretratada con ultrasonido u ozono .....	68
4.8.1 Solución de acetato de celulosa (AC) .....	68
4.8.2 Solución de proteína del consorcio D en ácido acético al 80% .....	68
4.8.3 Preparación de solución de proteína y AC 17%/proteína .....	68
4.8.4 Caracterización de soluciones de proteína y AC 17%/proteína .....	69
4.8.5 Procesamiento y caracterización de membranas AC 17%/proteína .....	69

## Índice

---

4.9 Obtención de membranas de nanofibras por electrohilado a partir de proteínas de biomasa de microalgas del consorcio S pretratada con ultrasonido u ozono .....	70
4.9.1 Solución de acetato poli(óxido de etileno) (PEO) .....	70
4.9.2 Soluciones de proteína del consorcio S .....	70
4.9.3 Preparación de soluciones de proteína y PEO 3.5%/proteína.....	70
4.9.4 Caracterización de soluciones de proteína y PEO 3.5%/proteína.....	71
4.9.5 Procesamiento y caracterización de membranas PEO 3.5%/proteína .....	71
4.10 Pretratamiento combinado de ultrasonido y ozono para la recuperación de biocomponentes microalgales y fósforo.....	71
4.10.1 Diseño de experimentos.....	71
4.10.2 Extracción y cuantificación de biocomponentes.....	72
4.10.3 Análisis de fósforo .....	72
<b>5. Resultados y discusión .....</b>	<b>73</b>
5.1 Cultivo de biomasa de microalgas .....	74
5.1.1 Cultivo de biomasa del consorcio D .....	74
5.1.2 Cultivo de biomasa del consorcio S.....	75
5.2 Pretratamiento de biomasa de microalgas de los consorcios D y S con ultrasonido u ozono .....	77
5.2.1 Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la disrupción celular y eficiencia de recuperación de biocomponentes .....	77
5.2.2 Efecto del pretratamiento con ozono en la disrupción celular y eficiencia de recuperación de biocomponentes.....	84
5.2.3 Función de deseabilidad para la recuperación en tándem de biocomponentes microalgales .....	92
5.2.4 Efecto del pretratamiento en la composición de los lípidos recuperados .....	94
5.2.5 Balance de masa.....	97
5.2.6 Comparación con estudios previos .....	99
5.2.7 Intensificación de los procesos de extracción de biocomponentes .....	102
5.3 Identificación de proteínas y efecto del pretratamiento en la fracción proteica de biomasa microalgal.....	104
5.3.1 Identificación de proteínas presentes en biomasa de los consorcios D y S .....	104
5.3.2 Efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono en el perfil electroforético de las proteínas.....	108
5.3.3 Efecto del pretratamiento en la solubilidad de proteínas .....	112
5.3.4 Efecto del pretratamiento en el contenido de grupos disulfuro y sulfhidrilo.....	114
5.3.5 Efecto del pretratamiento en las propiedades térmicas de las proteínas.....	115
5.4 Obtención de bioplásticos con base en biomasa de microalgas .....	120

## Índice

---

5.4.1 Caracterización térmica de biomasa de microalgas .....	120
5.4.2 Obtención de las mezclas biomasa/glicerol (60/40) mediante mezclado termoplástico.....	120
5.4.3 Caracterización térmica de las mezclas .....	121
5.4.4 Proceso de moldeo por inyección .....	122
5.4.5 Caracterización reológica de los bioplásticos .....	123
5.4.6 Análisis térmico-mecánico-dinámico .....	124
5.4.7 Mediciones de resistencia a la tracción.....	124
5.4.8 Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble.....	126
5.5 Obtención de biocompositos con base en PCL y biomasa residual de microalgas de los consorcios D y S.....	130
5.5.1 Caracterización de biomasa residual.....	130
5.5.2 Obtención de las mezclas biomasa/GL/PCL mediante mezclado termoplástico..	130
5.5.3 Proceso de moldeo por inyección .....	131
5.5.4 Caracterización reológica de biocompositos .....	132
5.5.5 Mediciones de resistencia a la tracción.....	136
5.5.6 Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble.....	138
5.6 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de proteínas de biomasa del consorcio D .....	145
5.6.1 Obtención de membranas de electrohilado, a partir de proteína de biomasa del consorcio D en solución al 5% .....	145
5.6.2 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de los sistemas AC 17%/proteínas de biomasa del consorcio D .....	147
5.6.2.1 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema AC 17%/proteínas de biomasa del consorcio D sin pretratamiento .....	147
5.6.2.2 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema AC 17%/proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) .....	151
5.6.2.3 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema AC 17%/proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa) .....	154
5.6.2.4 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema AC 17%/proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L) .....	156
5.7 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de proteínas de biomasa del consorcio S.....	159
5.7.1 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de proteína de biomasa del consorcio S en solución .....	159
5.7.2 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de los sistemas PEO 5.5%/proteínas de biomasa del consorcio S.....	164

## Índice

---

5.7.2.1 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema PEO 5.5%/proteínas de biomasa del consorcio S sin pretratamiento.....	164
5.7.2.2 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema PEO 5.5%/proteínas de biomasa del consorcio S con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) ...	168
5.7.2.3 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema PEO 5.5%/proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L).....	173
5.8 Pretratamiento combinado de ultrasonido y ozono, para la recuperación en tándem de lípidos, proteínas, carbohidratos y fósforo .....	178
5.8.1 Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la disrupción celular, liberación de proteínas y extracción de lípidos .....	178
5.8.2 Efecto del pretratamiento con ozono en la liberación de carbohidratos .....	179
5.8.3 Efecto del pretratamiento con ozono en la liberación de fósforo total y ortofosfatos .....	182
5.8.4 Valorización simultanea de carbohidratos y fósforo de biomasa de microalgas ..	186
5.8.5 Intensificación de la recuperación en tándem de biocompositos de biomasa de microalgas y fósforo .....	188
5.8.6 Comparación con otros estudios .....	189
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>191</b>
<b>7. Productos generados .....</b>	<b>195</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>197</b>

ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de la célula microalgal .....	12
<b>Figura 2.</b> Proceso de cultivo de biomasa de microalgas en agua residual.....	15
<b>Figura 3.</b> Diagrama de flujo del proceso de biorrefinería de biomasa de microalgas .....	18
<b>Figura 4.</b> Clasificación de los métodos de disrupción celular .....	21
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografías electrónicas de barrido de <i>Scenedesmus quadricauda</i> (100 000 células/ml) antes y después de la oxidación: (a Sin ozono, (b 1 mg de O <sub>3</sub> /L, (c 3 mg de O <sub>3</sub> /L, (d 8 mg de O <sub>3</sub> /L ozono, barra de escala 5 micras.....	24
<b>Figura 6.</b> Estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de proteínas .....	27
<b>Figura 7.</b> Cambio general en el módulo de almacenamiento de proteínas y polímeros sintéticos con un cambio de temperatura .....	31
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de un proceso termoplástico aplicado a un material con base en proteínas.....	35
<b>Figura 9.</b> Equipo de electrohilado.....	42
<b>Figura 10.</b> Ciclo del fósforo.....	51
<b>Figura 11.</b> Tiempo estimado para el pico de fósforo .....	51
<b>Figura 12.</b> Ubicación estimada de P en <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803: a la izquierda composición elemental, al centro composición biológica y a la derecha contenido de fósforo en ADN, ARN y lípidos. Todos los números dados son en por ciento en peso de la biomasa total o P total en la biomasa .....	55
<b>Figura 13.</b> Diagrama de flujo de la metodología experimental .....	58
<b>Figura 14.</b> Cultivos del consorcio D con a) <i>Mychonastes</i> y b) <i>Chlorococcum</i> (x40).....	74
<b>Figura 15.</b> Curva de crecimiento de biomasa del consorcio D y remoción de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , TP y orto-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> .....	75
<b>Figura 16.</b> Cultivo del consorcio S con <i>Mychonastes</i> (x40).....	76
<b>Figura 17.</b> Curva de crecimiento de biomasa del consorcio S y remoción de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , TP y orto-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> .....	76
<b>Figura 18.</b> Superficie de respuesta del rendimiento de a) proteínas, b) carbohidratos y c) lípidos de biomasa del consorcio D liberados en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos.....	78
<b>Figura 19.</b> Superficie de respuesta del rendimiento de a) proteínas, b) carbohidratos y c) lípidos de biomasa del consorcio S liberados. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos .....	79
<b>Figura 20.</b> Superficie de respuesta del rendimiento de a) proteínas y b) carbohidratos de biomasa del consorcio D recuperados en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3).....	81

## Índice de figuras

---

- Figura 21.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) proteínas, b) carbohidratos y c) lípidos de biomasa del consorcio S recuperados en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3). .....82
- Figura 22.** Fotomicrografías electrónicas de barrido (MEB) de a) *Desmodesmus sp.* y b) *Scenedesmus obliquus*.....83
- Figura 23.** Superficie de respuesta del rendimiento de lípidos de biomasa del consorcio S recuperados en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos .....84
- Figura 24.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) carbohidratos, b) proteínas y c) lípidos de biomasa del consorcio D liberados en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3)......85
- Figura 25.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) carbohidratos, b) proteínas y c) lípidos de biomasa del consorcio S liberados en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos .....86
- Figura 26.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) carbohidratos, b) proteínas y c) lípidos de biomasa de del consorcio D recuperados en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos.....89
- Figura 27.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) carbohidratos, b) proteínas y c) lípidos de biomasa del consorcio S recuperados en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos .....91
- Figura 28.** Superficie de respuesta para la deseabilidad observada del proceso de pretratamiento de biomasa del consorcio D con ultrasonido en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa .....92
- Figura 29.** Superficie de respuesta para la deseabilidad observada del proceso de pretratamiento de biomasa de del consorcio S con ultrasonido en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa .....93
- Figura 30.** Superficie de respuesta para la deseabilidad observada del proceso de pretratamiento de biomasa del consorcio D con ozono en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa .....93
- Figura 31.** Superficie de respuesta para la deseabilidad observada del proceso de pretratamiento de biomasa del consorcio S con ozono en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa .....94
- Figura 32.** Grafico del efecto del pretratamiento con ultrasonido en la composición de los lípidos recuperados de biomasa del consorcio D en función de la energía aplicada y la concentración de biomasa .....95
- Figura 33.** Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la composición de los lípidos recuperados de biomasa del consorcio S en función de la energía aplicada .....95
- Figura 34.** Efecto del pretratamiento con ozono en la composición de los lípidos recuperados de biomasa del consorcio D en función del tiempo de contacto .....96

## Índice de figuras

---

<b>Figura 35.</b> Efecto del pretratamiento con ozono en la composición de los lípidos recuperados de biomasa del consorcio S en función del tiempo de contacto .....	97
<b>Figura 36.</b> Balance de masa para el pretratamiento con ultrasonido de a) consorcio D y b) consorcio S a una intensidad ultrasónica de 0.32 W/mL en función de la energía aplicada y concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos .....	98
<b>Figura 37.</b> Balance de masa para el pretratamiento con ozono de a) consorcio D a concentración de ozono de 9 mg O <sub>3</sub> /L y b) consorcio S a una concentración de ozono de 6 mg O <sub>3</sub> /L en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos .....	99
<b>Figura 38.</b> Perfil de SDS-PAGE de proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ozono (DO <sub>3</sub> 1 y DO <sub>3</sub> 2) y ultrasonido (DU1, DU2, DU3 y DU4).....	109
<b>Figura 39.</b> Perfil de SDS-PAGE de proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ozono (SO <sub>3</sub> 1 y SO <sub>3</sub> 2) y ultrasonido (SU1 y SU2) .....	111
<b>Figura 40.</b> Efecto del pretratamiento en con ultrasonido u ozono en la solubilidad de proteínas de biomasa del consorcio D.....	112
<b>Figura 41.</b> Efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono en la solubilidad de proteínas de biomasa del consorcio S.....	113
<b>Figura 42.</b> Efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono en el contenido de grupos disulfuro y sulfhidrilo en proteínas de biomasa del consorcio D.....	114
<b>Figura 43.</b> Efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono en el contenido de grupos disulfuro y sulfhidrilo en proteínas de biomasa del consorcio S.....	114
<b>Figura 44.</b> Termogramas de DSC de proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ultrasonido .....	116
<b>Figura 45.</b> Termogramas de DSC de proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ozono .....	117
<b>Figura 46.</b> Termogramas de DSC de proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ultrasonido.....	118
<b>Figura 47.</b> Termogramas de DSC de proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ozono .....	119
<b>Figura 48.</b> Termogramas de DSC de biomasa de los consorcios D y S .....	120
<b>Figura 49.</b> Evolución del torque e incremento de temperatura durante el proceso de mezclado de los sistemas biomasa/glicerol.....	121
<b>Figura 50.</b> Valores de módulo elástico (G') y tangente de pérdida (δ) en función de la temperatura del análisis térmico-mecánico-dinámico llevado a cabo a frecuencia constante (1 Hz) y velocidad de calentamiento (3 °C/min) .....	124
<b>Figura 51.</b> Curvas de tensión-deformación para los bioplásticos con base en biomasa de a) consorcio D y b) consorcio S/glicerol molde (80, 100 y 120 °C).....	125



<b>Figura 52.</b> Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble después de 24 h de inmersión para los bioplásticos con base en proteínas de biomasa de a) consorcio D y b) consorcio S .....	126
<b>Figura 53.</b> Imágenes de microscopia electrónica de barrido (MEB) para los bioplásticos con base en biomasa del consorcio D a tres temperaturas de molde a) 80, b) 100 y c) 120 °C y con base en biomasa del consorcio S a tres temperaturas de molde d) 80, e) 100 y f) 120 °C después de 24 h de inmersión en agua .....	127
<b>Figura 54.</b> Perfiles del incremento de temperatura y torque obtenidos sobre el tiempo de mezclado para las mezclas (biomasa/GL/PCL) con base en biomasa de a) consorcio D y b) consorcio S como función de la concentración de PCL (0%, 5%, 10% y 20%) .....	130
<b>Figura 55.</b> Pruebas de barrido de frecuencia dinámica para las mezclas (biomasa/GL/PCL) de biomasa de a) consorcio D y b) consorcio S realizados en función de la frecuencia (de 0.05 a 20 Hz). El recuadro muestra la evolución del módulo elástico, viscoso y $\tan \delta$ como función del contenido de PCL.....	131
<b>Figura 56.</b> Evolución de los módulos viscoelásticos ( $G'$ y $G''$ ) y de la viscosidad a 1 Hz para los biocompositos con base en biomasa de consorcio D a las temperaturas de moldeo de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C en función de la concentración de PCL. Los resultados se obtuvieron a partir de barrido de frecuencia dinámica (de 0.05 a 20 Hz) .....	132
<b>Figura 57.</b> Evolución de los módulos viscoelásticos ( $G'$ y $G''$ ) y de la viscosidad a 1 Hz para los biocompositos con base en biomasa de consorcio S a las temperaturas de moldeo de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C en función de la concentración de PCL. Los resultados se obtuvieron a partir de barrido de frecuencia dinámica (de 0.05 a 20 Hz) .....	133
<b>Figura 58.</b> Módulo elástico ( $G'$ ) y tangente de pérdida ( $\delta$ ) para los biocompositos con base en biomasa de consorcio D a las temperaturas de moldeo de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C en función de la temperatura (de 25 a 150 °C). Los resultados se obtuvieron a partir de análisis mecánico dinámico (DMA).....	134
<b>Figura 59.</b> Módulo elástico ( $G'$ ) y tangente de pérdida ( $\delta$ ) para los biocompositos con base en biomasa de consorcio S a las temperaturas de moldeo de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C en función de la temperatura (de 25 a 150 °C). Los resultados se obtuvieron a partir de análisis mecánico dinámico (DMA).....	135
<b>Figura 60.</b> Curvas de tensión obtenidas de las pruebas de tensión uniaxiales para los sistemas con base en biomasa de consorcio D y PCL (0, 5, 10 y 20%) a temperatura de moldeo de a) 80 y 100 °C y b) 120 °C.....	136
<b>Figura 61.</b> Curvas de tensión obtenidas de las pruebas de tensión uniaxiales para los sistemas con base en biomasa de consorcio S y PCL (0, 5, 10 y 20%) .....	137
<b>Figura 62.</b> Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble después de 24 h de inmersión para los sistemas con base en biomasa de consorcio D y PCL (0, 5, 10 y 20%) a temperatura de molde de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C.....	139
<b>Figura 63.</b> Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble después de 24 h de inmersión para los sistemas con base en biomasa de consorcio S y PCL (0, 5, 10 y 20%) a temperatura de molde de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C.....	141

- Figura 64.** Imágenes de microscopia (MEB) a la escala de 2  $\mu\text{m}$  (magnificación x2000) de a) membrana de electrohilado de AC y electroespreados de proteína del consorcio D b) sin pretratamiento, c) pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg de biomasa), d) pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg de biomasa) y e) pretratada con ozono (9 mg  $\text{O}_3/\text{L}$ ).....147
- Figura 65.** Graficas de: a) viscosidad frente a la deformación de los sistemas AC/proteína de consorcio D sin pretratamiento a 25  $^\circ\text{C}$ , y b) propiedades viscoelásticos lineales en función de la frecuencia de los sistemas AC/proteína de consorcio D sin pretratamiento a 25  $^\circ\text{C}$ .....149
- Figura 66.** Imágenes por microscopia (MEB) a escala de 1  $\mu\text{m}$  (magnificación x10 000) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) AC 17% y AC 17%/proteína del consorcio D sin pretratamiento a: b) 1.25%, c) 2.5% y d) 5% en peso .....149
- Figura 67.** Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) a 25  $^\circ\text{C}$  y b) propiedades viscoelásticos lineales en función de la frecuencia de los sistemas AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) a 25  $^\circ\text{C}$  .....152
- Figura 68.** Imágenes por microscopia (MEB) a escala de 1  $\mu\text{m}$  (magnificación x10 000) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) AC 17% y AC17%/proteína de biomasa del consorcio D, pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) a: b) 1.25%, c) 2.5% y d) 5% en peso .....152
- Figura 69.** Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa) a 25  $^\circ\text{C}$  y b) propiedades viscoelásticos lineales en función de la frecuencia de los sistemas AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa) a 25  $^\circ\text{C}$  .....155
- Figura 70.** Imágenes por microscopia (MEB) a escala de 1  $\mu\text{m}$  (magnificación x10 000) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) AC 17% y AC17%/ proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa) a: b) 1.25%, c) 2.5% y d) 5% en peso .....155
- Figura 71.** Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ozono (9 mg  $\text{O}_3/\text{L}$ ) a 25  $^\circ\text{C}$  y b) propiedades viscoelásticos lineales en función de la frecuencia de los sistemas AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ozono (9 mg  $\text{O}_3/\text{L}$ ) a 25  $^\circ\text{C}$  .....157
- Figura 72.** Imágenes de microscopia (MEB) a escala de 1  $\mu\text{m}$  (magnificación x 10 000) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) AC 17% y AC 17%/ proteína del consorcio D, pretratada con ozono (9 mg  $\text{O}_3/\text{L}$ ) a: b) 1.25%, c) 2.5%, y d) 5% en peso.....158
- Figura 73.** Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S sin pretratar a 25  $^\circ\text{C}$  y b) propiedades viscoelásticos lineales en función de la frecuencia de los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S sin pretratar a 25  $^\circ\text{C}$  .....165
- Figura 74.** Imágenes por microscopia (MEB) a escala de 1  $\mu\text{m}$  (magnificación x10 000) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) PEO 3.5% y PEO 3.5%/ proteína del consorcio S sin pretratamiento a: b) 0.75%, (c) 1.25% y d) 2.5% en peso.....166
- Figura 75.** Ensayo de tracción para los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S sin pretratamiento .....168

<b>Figura 76.</b> Grafica de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) a 25 °C y b) propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia de los sistemas PEO 3.5%/proteína pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) a 25 °C.....	169
<b>Figura 77.</b> Imágenes de microscopia (MEB) a escala de 1 μm (magnificación x10 000) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) PEO 3.5% y PEO 3.5%/ proteína del consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) a: b) 0.75%, c) 1.25% y d) 2.5% en peso ....	170
<b>Figura 78.</b> Ensayo de tracción hasta la rotura para los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa).....	172
<b>Figura 79.</b> Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L) a 25 °C y b) propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia de los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L) a 25 °C.....	174
<b>Figura 80.</b> Imágenes de microscopia (MEB) a escala de 1 μm (magnificación x10 000) de las membranas de electrohilado de los sistemas a) PEO 3.5% y PEO 3.5%/ proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L) a b) 0.75%, c) 1.25% y d) 2.5% en peso.....	174
<b>Figura 81.</b> Ensayo de tracción hasta la rotura para los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L) .....	176
<b>Figura 82.</b> Superficie de respuesta del rendimiento de carbohidratos de biomasa del consorcio D, liberados en función del tiempo de contacto y la concentración de ozono. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos .....	179
<b>Figura 83.</b> Superficie de respuesta del rendimiento de carbohidratos de biomasa del consorcio S, liberados en función del pH y la concentración de ozono. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos. ....	180
<b>Figura 84.</b> Superficie de respuesta del rendimiento de a) fósforo total y b) ortofosfatos de biomasa del consorcio D, liberados en función del pH y del tiempo de contacto. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos .....	183
<b>Figura 85.</b> Superficie de respuesta del rendimiento de a) fósforo total y b) ortofosfatos de biomasa del consorcio S, liberados en función del pH y el tiempo de contacto. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos .....	184
<b>Figura 86.</b> Superficie de respuesta de la función de deseabilidad para la recuperación de carbohidratos y fósforo de biomasa del consorcio D, en función del pH y el tiempo de contacto. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos.....	187
<b>Figura 87.</b> Superficie de respuesta de la función de deseabilidad para la recuperación de carbohidratos y fósforo de biomasa del consorcio S, en función del tiempo de contacto y la concentración de ozono. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos .....	187

ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición aproximada de varias especies de microalgas .....	12
<b>Tabla 2.</b> Factores generales que influyen en la transición vítrea de proteínas y la forma en la que se presentan.....	30
<b>Tabla 3.</b> Efecto del contenido de humedad en la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de diferentes bioplásticos con base en proteínas .....	34
<b>Tabla 4.</b> Propiedades mecánicas de proteínas procesadas mediante un proceso termo-mecánico, plastificadas con agua y glicerol.....	41
<b>Tabla 5.</b> Composición bioquímica de la biomasa de los consorcios D y S .....	59
<b>Tabla 6.</b> Metodología usada para la caracterización fisicoquímica de los cultivos de microalgas .....	60
<b>Tabla 7.</b> Soluciones de AC/proteína electrohiladas .....	69
<b>Tabla 8.</b> Concentración de las soluciones de proteína del consorcio S electrohiladas .....	71
<b>Tabla 9.</b> Concentración de las soluciones de PEO/proteína electrohiladas .....	71
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de proteínas, carbohidratos y lípidos liberados después del pretratamiento de biomasa de los consorcios D y S con ultrasonido (n=3).....	77
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de proteínas, carbohidratos y lípidos recuperado después del pretratamiento de biomasa del consorcio D con ultrasonido (n=3) .....	80
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de proteínas, carbohidratos y lípidos recuperado después del pretratamiento de biomasa del consorcio S con ultrasonido (n=3).....	82
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de carbohidratos, proteínas y lípidos liberados después del pretratamiento de biomasa de microalgas de los consorcio D y S con ozono (n=3) .....	84
<b>Tabla 14.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de carbohidratos, proteínas y lípidos recuperado después del pretratamiento de biomasa del consorcio D con ozono (n=3) .....	88
<b>Tabla 15.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de carbohidratos, proteínas y lípidos recuperado después del pretratamiento de biomasa del consorcio S con ozono (n=3) .....	90
<b>Tabla 16.</b> Sumario y comparación de casos de estudio del pretratamiento de biomasa de microalgas con ultrasonido u ozono con este estudio.....	101
<b>Tabla 17.</b> Sumario y comparación de casos publicados de la intensificación del proceso de recuperación de biocomponentes con ultrasonido u ozono con este estudio.....	103

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 18.</b> Proteínas identificadas mediante análisis de péptidos por espectrometría de masas en biomasa del consorcio D.....	105
<b>Tabla 19.</b> Proteínas identificadas mediante análisis de péptidos por espectrometría de masas en biomasa del consorcio S.....	106
<b>Tabla 20.</b> Proteínas identificadas mediante análisis de péptidos por espectrometría de masas en biomasa del consorcio S.....	107
<b>Tabla 21.</b> Condiciones experimentales estudiadas en el efecto del pretratamiento en la fracción proteína de biomasa de los consorcios D y S .....	108
<b>Tabla 22.</b> Densitometría del perfil de SDS-PAGE de proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ozono (DO <sub>31</sub> y DO <sub>32</sub> ) y ultrasonido (DU1, DU2, DU3 y DU4) .....	109
<b>Tabla 23.</b> Densitometría del perfil de SDS-PAGE de proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ozono (SO <sub>31</sub> y SO <sub>32</sub> ) y ultrasonido (SU1 y SU2).....	111
<b>Tabla 24.</b> Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la T <sub>g</sub> , T <sub>d</sub> y ΔH <sub>d</sub> de las proteínas de biomasa del consorcio D .....	115
<b>Tabla 25.</b> Efecto del pretratamiento con ozono en la T <sub>g</sub> , T <sub>d</sub> y ΔH <sub>d</sub> de las proteínas de biomasa de consorcio D .....	116
<b>Tabla 26.</b> Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la T <sub>g</sub> , T <sub>d</sub> y ΔH <sub>d</sub> de las proteínas de biomasa de consorcio S .....	118
<b>Tabla 27.</b> Efecto del pretratamiento con ozono en la T <sub>g</sub> , T <sub>d</sub> y ΔH <sub>d</sub> de las proteínas de biomasa de consorcio S.....	119
<b>Tabla 28.</b> Modulo elástico (G'), módulo viscoso (G'') y tangente de perdida (δ) a 1 Hz y 5 °C/min como función de la temperatura para las mezclas de biomasa de los consorcio D o S/glicerol (60/40).....	122
<b>Tabla 29.</b> Condiciones de operación para el moldeo por inyección de las masas biomasa de microalgas/glicerol (60/40).....	122
<b>Tabla 30.</b> Modulo elástico (G'), módulo viscoso (G'') y tangente de pérdida (δ) a 1 Hz, como función de la frecuencia para las mezclas de biomasa de los consorcio D o S/glicerol (60/40) .	123
<b>Tabla 31.</b> Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo (σ <sub>max</sub> ) y deformación a la rotura (ε <sub>r</sub> ) para los bioplásticos con base en proteínas de biomasa de los consorcio D y S.....	126
<b>Tabla 32.</b> Comparación de casos de estudio de obtención de bioplásticos con base en proteína .....	129
<b>Tabla 33.</b> Composición de la biomasa residual de los consorcios D y S utilizada para la producción de biocompositos .....	130
<b>Tabla 34.</b> Condiciones de operación para el moldeo por inyección de biocompositos con base en biomasa de microalgas .....	131
<b>Tabla 35.</b> Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo (σ <sub>max</sub> ) y deformación a la rotura (ε <sub>r</sub> ) para los sistemas con base en biomasa del consorcio D y PCL.....	136

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 36.</b> Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo ( $\sigma_{\max}$ ) y deformación a la rotura ( $\epsilon_r$ ) para los sistemas con base en biomasa del consorcio S y PCL.....	138
<b>Tabla 37.</b> Imágenes por microscopia electrónica de barrido (MEB) de los biocompositos con base en biomasa del consorcio D .....	140
<b>Tabla 38.</b> Imágenes por microscopia electrónica de barrido (MEB) de los biocompositos con base en biomasa del consorcio S.....	142
<b>Tabla 39.</b> Comparación de casos de estudio de obtención de biocompositos con base en biomasa de microalgas .....	144
<b>Tabla 40.</b> Propiedades físicas de las soluciones de proteína de biomasa del consorcio D a 25 °C .....	146
<b>Tabla 41.</b> Propiedades físicas de las soluciones AC/proteína de biomasa de consorcio D sin pretratamiento a 25 °C .....	148
<b>Tabla 42.</b> Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas AC 17%/proteínas del Consorcio D sin pretratamiento, en función de la concentración .....	150
<b>Tabla 43.</b> Propiedades físicas de las soluciones AC/proteína de consorcio D, pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg de biomasa) y 25 °C.....	151
<b>Tabla 44.</b> Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas AC 17%/proteínas de consorcio D, pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa), en función de la concentración .....	153
<b>Tabla 45.</b> Propiedades físicas de las soluciones AC 17%/proteína de consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg de biomasa) a 25 °C.....	154
<b>Tabla 46.</b> Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas AC 17%/proteínas del Consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa), en función de la concentración .....	156
<b>Tabla 47.</b> Propiedades físicas de los sistemas AC 17%/de proteína de consorcio D, pretratada con ozono a 9 mg O <sub>3</sub> /L y 25 °C.....	156
<b>Tabla 48.</b> Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas AC 17%/proteínas de consorcio D, pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L), en función de la concentración .....	159
<b>Tabla 49.</b> Propiedades físicas de las soluciones de proteína de consorcio S en Tris base (pH 8.94) 2.5% y 5% en peso.....	160
<b>Tabla 50.</b> Propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia (1Hz) de las soluciones de proteína de consorcio S en Tris base (pH 8.94) al 2.5% y 5% en peso.....	161
<b>Tabla 51.</b> Imágenes por microscopia (MEB) de los electroespreados de proteína del consorcio S disueltas en Tris base a 2.5 y 5% en peso y potencial eléctrico de 9, 12 y 15 kV, (magnificación x2 000) .....	162
<b>Tabla 52.</b> Imágenes por microscopia (MEB) de los electroespreados de proteína del consorcio S disueltas en Tris base a 2.5 y 5% en peso y potencial eléctrico de 9, 12 y 15 kV, (magnificación x2 000) .....	163

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 53.</b> Propiedades físicas de los sistemas PEO 3.5%/proteína de biomasa de consorcio S no pretratada.....	164
<b>Tabla 54.</b> Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas PEO 3.5%/proteínas de consorcio S sin pretratamiento, en función de la concentración.....	166
<b>Tabla 55.</b> Propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia (1Hz) de los sistemas PEO 3.5/proteína de consorcio S sin pretratamiento .....	167
<b>Tabla 56.</b> Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo ( $\sigma_{\max}$ ) y deformación máxima a la rotura ( $\epsilon_r$ ) para los sistemas: PEO 3.5%/proteína de consorcio S sin pretratamiento .....	168
<b>Tabla 57.</b> Propiedades físicas de los sistemas PEO 3.5%/proteína de biomasa de consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/gr biomasa).....	169
<b>Tabla 58.</b> Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas PEO 3.5%/proteínas de consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg), en función de la concentración .....	171
<b>Tabla 59.</b> Propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia (1Hz) de los sistemas PEO 3.5/proteína de consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg), en función de la concentración .....	171
<b>Tabla 60.</b> Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo ( $\sigma_{\max}$ ) y deformación máxima a la rotura ( $\epsilon_r$ ) para los sistemas: PEO 3.5%/proteína de consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa).....	172
<b>Tabla 61.</b> Propiedades físicas de los sistemas PEO 3.5%/proteína de biomasa de consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L) .....	173
<b>Tabla 62.</b> Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas PEO 3.5%/proteínas de consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L), en función de la concentración .....	175
<b>Tabla 63.</b> Propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia (1Hz) de los sistemas PEO 3.5/proteína de consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L), en función de la concentración .....	176
<b>Tabla 64.</b> Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo ( $\sigma_{\max}$ ) y deformación máxima a la rotura ( $\epsilon_r$ ) para los sistemas: PEO 3.5%/proteína de consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L).....	177
<b>Tabla 65.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de carbohidratos liberados de biomasa del consorcio D después del pretratamiento con ultrasonido y ozono (n=3).....	179
<b>Tabla 66.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de carbohidratos liberados después del pretratamiento de biomasa del consorcio S con ultrasonido y ozono (n=3) .....	180
<b>Tabla 67.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de TP y orto-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> liberados después del pretratamiento de biomasa del consorcio D con ultrasonido y ozono (n=3).....	182

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 68.</b> Sumario y comparación de casos de estudio de recuperación de fósforo de bioma de microalgas con este estudio .....	190
---	-----



# RESUMEN

### RESUMEN

En este trabajo de investigación se estudió el pretratamiento con ultrasonido u ozono de biomasa de dos consorcios de microalgas cultivada en agua residual, con fines de biorrefinería de multiproductos para llevar a cabo la valorización de las fracciones de proteínas y fósforo. La biomasa se cultivó en agua residual municipal proveniente de la planta de tratamiento ubicada en cerro del agua, ciudad universitaria. El primer consorcio se obtuvo a partir del cultivo de biomasa rica en *Desmodesmus sp.* (consorcio D), el segundo a partir de biomasa rica en *Scenedesmus obliquus* (consorcio S). La biomasa cultivada se cosecho por sedimentación, posteriormente fue pretratada con ultrasonido u ozono para evaluar la recuperación en tándem de los biocomponentes microalgales (lípidos, proteínas y carbohidratos). En el caso del pretratamiento con ultrasonido, los parámetros independientes evaluados fueron: energía aplicada (50-200 kWh/kg de biomasa seca), concentración de biomasa (25-75 g/L) e intensidad ultrasónica (0.32 y 0.53 W/mL). Mientras que, para el pretratamiento con ozono los parámetros independientes evaluados fueron: concentración de ozono (3-9 mg O<sub>3</sub>/L), concentración de biomasa (25-75 g/L) y tiempo de contacto (5-15 min).

En el caso del pretratamiento de biomasa del consorcio D con ultrasonido, los máximos rendimientos de recuperación alcanzados fueron:  $97 \pm 0.4\%$ ,  $89 \pm 3\%$  y  $73 \pm 0.6\%$  para proteínas, carbohidratos y lípidos, respectivamente. A las condiciones experimentales de: energía aplicada de 50 kWh/kg de biomasa seca, 75 g/L de concentración de biomasa, 0.32 W/mL de intensidad ultrasónica. Por otra parte, los rendimientos máximos de recuperación alcanzados para proteínas, carbohidratos y lípidos, después del pretratamiento de biomasa del consorcio S fueron  $83 \pm 7\%$ ,  $77 \pm 2\%$  y  $90 \pm 2\%$ , respectivamente. A las condiciones experimentales de: concentración de suspensión de 25 g/L, energía aplicada de 200 kWh/kg de biomasa seca e intensidad ultrasónica de 0.32 W/mL. Para ambas especies de biomasa, el ultrasonido causó alta disrupción celular liberando todas las proteínas al medio acuoso, evitando así el proceso de recuperación posterior.

Los rendimientos máximos de recuperación de carbohidratos, lípidos y proteínas después del pretratamiento de biomasa del consorcio D con ozono fueron:  $85 \pm 2\%$ ,  $48 \pm 1\%$  y  $25 \pm 1\%$ , respectivamente, bajo las condiciones experimentales de: 9 mg O<sub>3</sub>/L de concentración de ozono, 25 g/L de concentración de biomasa y 5 minutos de tiempo de contacto. Mientras que, el pretratamiento de biomasa del consorcio S con ozono a una concentración de ozono de 6 mg O<sub>3</sub>/L, concentración de biomasa de 50 g/L y tiempo de contacto de 10 min logró la máxima eficiencia de recuperación de biocomponentes. A estas condiciones experimentales se alcanzaron rendimientos máximos de carbohidratos recuperados de  $92 \pm 2\%$ , lípidos de  $37 \pm 5\%$  y proteínas de  $56 \pm 4\%$ . Para la recuperación de todos los biocomponentes fue necesario el pretratamiento con ozono y un proceso de extracción adicional.

Ambos pretratamientos, ultrasonido y ozono, intensificaron el proceso de disrupción celular y de recuperación de biocomponentes, al reducir el consumo de solventes en al menos un 92% y el tiempo de extracción entre 80% y 90%, en comparación con la extracción de biocomponentes de biomasa no pretratada. Además, mejoraron la composición de los lípidos recuperados, el rendimiento de lípidos neutros aumentó del 28% al 67% para el pretratamiento con ultrasonido, mientras que para el pretratamiento con ozono del 49% al 63%.

Posteriormente se estudió el efecto de los pretratamientos en la estructura, peso molecular, solubilidad y propiedad térmicas de las proteínas presentes en cada tipo de biomasa, con el objetivo

de evaluar su potencial aplicación en la producción de bioplásticos. Se observó que ambos pretratamientos indujeron la disminución del peso molecular y el incremento en la degradación de proteínas. El pretratamiento de la biomasa también indujo un incremento en la solubilidad de las proteínas en 10% a pH ácidos, debido a que ambos pretratamientos promueven un incremento en la cantidad de iones en las moléculas de proteína como consecuencia de las reacciones de radicales que llevan a cabo. El aumento en la degradación de proteína también muestra un efecto en la solubilidad. La solubilidad de las proteínas aumentó cuando la concentración de proteína degradada incrementó. Finalmente, ambos pretratamientos indujeron una disminución de entre 20-100 °C la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) de las proteínas de ambos tipos de biomasa, mientras que, la entalpia de desnaturalización disminuyó entre 10-50 °C. Estos resultados se correlacionan con la interrupción de una fracción de las fuerzas responsables de la estabilidad de las estructuras terciarias y secundarias de las proteínas, ya que la reducción de las fuerzas que mantienen unidas las cadenas de proteínas modifica su comportamiento térmico, al aumentar la movilidad molecular y disminuir la viscosidad. Como resultado se obtienen proteínas con mejores propiedades térmicas para la producción de un bioplástico.

A partir de los resultados que se obtuvieron en el estudio de las propiedades térmicas de las proteínas de ambos tipos de biomasa, se determinaron los parámetros experimentales para la producción de un bioplástico con base en biomasa de microalgas y glicerol como plastificante, y de un biocomposito con base en biomasa residual de microalgas, policaprolactona (PCL) y glicerol, ambos mediante un proceso termoplástico. Los parámetros experimentales evaluados durante la producción del bioplástico fueron la mezcla de biomasa /glicerol (60/40) y la temperatura de moldeo (80, 100 y 120 °C). Por otra parte, para la obtención del biocomposito los parámetros evaluados fueron la concentración de PCL (5%, 10%, y 20%) y la temperatura de moldeo (80, 100 y 120 °C). Los resultados mostraron que la pared celular de las microalgas jugó un papel importante en la obtención tanto de bioplásticos como de biocompositos. La pared celular de *Desmodesmus sp.* (la microalga que se encuentra en mayor proporción en el consorcio D) evita la interacción entre las proteínas de la biomasa y el glicerol en el caso de bioplásticos, y las proteínas de biomasa y el PCL en el caso de biocompositos, a pesar de que el pretratamiento de la biomasa debió mejorar esta interacción debido a la rotura de la pared celular. Por lo tanto, en el caso de biocompositos, fue necesario tener un contenido mínimo de PCL en la mezcla para mejorar las propiedades viscoelásticas de los materiales obtenidos. Esta barrera que ejerce la pared celular durante el proceso de obtención de los materiales, induce que tanto las propiedades viscoelásticas de los sistemas como el esfuerzo máximo disminuyan. Por lo tanto los materiales que mostraron mejores propiedades viscoelásticas y mecánicas fueron los que se obtuvieron con base en biomasa del consorcio S.

Los bioplásticos que se obtuvieron a partir de ambos tipos de biomasa mostraron propiedades viscoelásticas similares a los obtenidos con base en albúmina de huevo y otras especies de microalgas como *Spirulina plantesis* y *Chlorella vulgaris*. Además, mostraron una capacidad de absorción de agua de hasta 800%, lo que le da importantes aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales. Por otra parte, los biocompositos que se obtuvieron mostraron propiedades viscoelásticas similares a los obtenidos con base en biomasa de especies como *Spirulina plantesis* y *Chlorella vulgaris*. Sin embargo, los biocompositos que se obtienen en este estudio contienen 45% menos bioplástico sintético.

Las proteínas de biomasa de microalgas se valorizaron mediante la obtención de membranas de nanofibras por electrohilado. En el caso de proteínas de biomasa del consorcio D, se obtuvieron membranas de nanofibras con base en acetato de celulosa (AC)/proteína. Ninguna de las fibras de electrohilado que se obtuvieron a partir de los sistemas AC/proteína del consorcio D, presentó las propiedades necesarias para llevar a cabo un ensayo de tracción, lo que reduce considerablemente su área de aplicación. Sin embargo, el pretratamiento de la biomasa de microalgas del consorcio D con ozono favoreció el proceso de electrohilado, debido a que promueve la disminución del peso molecular de las proteínas en mayor medida que el pretratamiento con ultrasonido (a las condiciones experimentales estudiadas).

En el caso de proteínas de biomasa del consorcio S, se obtuvieron membranas de nanofibras de electrohilado con base en poli (óxido de etileno, PEO)/proteína. Las membranas que se obtuvieron con base en PEO/ proteína de biomasa del consorcio S pretratada con ultrasonido, fueron las que mostraron mejores propiedades mecánicas. El esfuerzo máximo incremento al doble con la adición de proteína en una concentración de 0.75% a la solución, en comparación con el PEO. El incremento en las propiedades mecánicas se atribuye a la adición de grupos hidroxilo y aumento en la concentración de grupos sulfhidrilo durante el pretratamiento. El aumento en la concentración de estos grupos favorece la formación de entrecruzamientos. El pretratamiento con ozono de la biomasa del consorcio S por otra parte, induce la reducción de las propiedades mecánicas de las membranas de electrohilado obtenidas. El pretratamiento con ozono también produce el aumento en la concentración de grupos sulfhidrilo en la estructura de las proteínas. Sin embargo, favorece en mayor medida la adición de grupos hidroxilo, lo que deriva en la formación de entrecruzamientos y de enlaces por puente de hidrogeno.

Finalmente, se obtuvo un proceso de pretratamiento secuencial con ultrasonido y ozono para la recuperación en tándem de biocomponentes microalgales y fosforo. Los parámetros evaluados fueron la concentración de ozono (9-45 mg O<sub>3</sub>/L), el tiempo de contacto (15-35 min) y el pH (8 y 11). Durante el pretratamiento de biomasa del consorcio D, los rendimientos máximos de recuperación para proteínas, lípidos, carbohidratos y fósforo fueron: 92 ± 0.4%, 68 ± 1%, 84% y 58%, respectivamente. A las condiciones experimentales de 50 kWh/kg de biomasa seca, 75 g/L de concentración de biomasa, 0.32 W/mL de intensidad ultrasónica para el pretratamiento con ultrasonido, y concentración de ozono de 45 mg O<sub>3</sub>/L, tiempo de contacto de 35 min y pH de 11, para el pretratamiento con ozono. En el caso de biomasa del consorcio S, el máximo rendimiento de biocomponentes y fósforo recuperado fueron: 91 ± 7%, 89 ± 2%, 62 ± 1% y 75 ± 0.3%, para proteínas, lípidos, carbohidratos y fósforo, respectivamente. A las condiciones experimentales de 200 kWh/kg de biomasa seca, 25 g/L de concentración de biomasa y 0.32 W/mL de intensidad ultrasónica para el pretratamiento con ultrasonido, y concentración de ozono de 27 mg O<sub>3</sub>/L, tiempo de contacto de 25 min y pH de 11, para el pretratamiento con ozono.

El pretratamiento combinado de ultrasonido y ozono intensifico la recuperación de biocomponentes microalgales y fósforo, incrementó la calidad de lípidos y carbohidratos recuperados y evitó el uso de compuestos químicos para la recuperación de proteínas, carbohidratos y fósforo. Además, los procesos de pretratamiento y recuperación se llevan a cabo a condiciones no intensivas, lo que puede disminuir el gasto de energía y costo de los procesos.

# INTRODUCCIÓN

### 1. INTRODUCCIÓN

El agotamiento de los combustibles fósiles, la contaminación ambiental y el cambio climático obliga a la búsqueda de fuentes sostenibles de energía para mantener la economía industrial y la sociedad [1]. Los biocombustibles son una alternativa a los combustibles derivados del petróleo debido a los problemas de escasez y de contaminación que causan los combustibles fósiles. Los biocombustibles de primera generación se obtienen a partir de sustratos agrícolas, destinados tradicionalmente para fines de consumo humano y animal. Sin embargo, el uso de estos sustratos lleva al dilema "alimentos versus combustible"[2]. Este dilema indujo al desarrollo de biocombustibles de segunda generación producidos a partir de biomasa de productos no alimentarios, como residuos de cultivos de rastrojo, maíz, papa, estiércol, paja y residuos de madera [1]. El uso de estos sustratos lignocelulósicos presenta ventajas como que son materiales abundantes, no son fuente de alimentos, son renovables y, por lo tanto, no crean competencia por tierras de cultivo. No obstante, es necesario llevar a cabo diversas etapas de pretratamiento que son caras para eliminar las barreras físicas de matrices lignocelulósicas y convertir estos sustratos en biocombustibles [3].

En este sentido, los biocombustibles de tercera generación derivados de algas y microalgas pueden ser considerados como una fuente de energía alternativa viable, que es desprovista de los principales inconvenientes asociados con los biocombustibles de primera y segunda generación [4]. El cultivo de microalgas presenta varias ventajas en comparación con las plantas terrestres, como mayor tasa de crecimiento (pueden duplicar su biomasa en 24 h), niveles superiores de fijación de CO<sub>2</sub>, no necesitan tierras de cultivo y permiten el uso de aguas no potables [1, 3]. Una de las limitaciones más importantes en el uso de microalgas para obtener biocombustibles es el costo operacional. El uso de agua residual como medio de cultivo de biomasa de microalgas se ha propuesto como una manera de disminuir el costo de operación, aunado a la remoción de nutrientes como nitrógeno, fósforo y carbono [3, 4]. No obstante, el implemento del uso de agua residual no es suficiente para que este proceso sea costeable. Otra estrategia que se propone para disminuir el costo de la producción de combustibles microalgales es una apropiada explotación de la biomasa.

Las microalgas contienen lípidos, proteínas y carbohidratos, que pueden usarse para diferentes aplicaciones [5]. Los lípidos se pueden usar como fuente de biocombustibles, materia prima en la industria química y aceites comestibles para el mercado de alimentos y salud. Las proteínas se pueden usar en el mercado de alimentos, salud, productos químicos a granel y bioplásticos. Finalmente, los carbohidratos pueden ser utilizados para producir biocombustibles y productos químicos [6]. Análogo a una refinería de petróleo, el fraccionamiento completo de los biocomponentes microalgales puede aumentar la viabilidad de la obtención de biocombustibles a base de microalgas. Este concepto se conoce como biorrefinería de multiproductos, tal facilidad consiste en valorizar cada uno de los biocomponentes microalgales [7]. Al explotar todo el potencial de las microalgas el valor de mercado de la biomasa de microalgas será mayor que el costo de producción de los productos obtenidos [8]. Sin embargo, las microalgas tienen una pared celular resistente, que debe romperse antes de poder extraer los productos de interés. Los estudios que se centran en la obtención de cierto producto a base de microalgas desarrollan métodos de extracción para una fracción de biomasa en específico. Esto significa que el resto de los biocomponentes disponibles en las microalgas se pierden en forma de residuos [9]. Para poder explotar la biomasa de microalgas de forma eficiente, es necesario enfocarse en mejorar los procesos de pretratamiento y extracción de biocomponentes microalgales. En consecuencia, existe

---

## 1. Introducción

---

la necesidad de desarrollar métodos de pretratamiento y técnicas de extracción factibles para fraccionar la biomasa de microalgas con fines de biorrefinería. Tales métodos de pretratamiento deben garantizar bajos costos operativos, alta eficiencia de recuperación de biocomponentes de la biomasa húmeda, bajo consumo de solventes y alta calidad de los productos extraídos [10]. Para lograr esto, es necesario comprender la composición química y la estructura de la pared celular de las microalgas, principalmente para que los métodos de pretratamiento puedan adaptarse a microalgas específicas [11]. Con el fin de mejorar la disrupción celular y la extracción de biocomponentes, se han probado varios métodos de pretratamiento. Dentro de estos métodos, el ultrasonido ha demostrado la capacidad de romper las paredes celulares de las microalgas y mejorar los rendimientos de extracción de lípidos y proteínas hasta en un 75% y 38%, respectivamente, con una reducción significativa de la temperatura de extracción, el consumo de solventes y el tiempo de extracción [12-14].

El pretratamiento con ozono es otra técnica que se ha utilizado como pretratamiento para mejorar una variedad de procesos, ya que la oxidación de células microalgales con ozono induce lisis celular, facilitando la liberación del material intracelular y la extracción de lípidos y proteínas. El pretratamiento con ozono, además, incrementa considerablemente la calidad de los lípidos recuperados, debido a que los ácidos grasos poliinsaturados son muy susceptibles a la oxidación por los radicales libres y oxidantes fuertes como el ozono [15].

Típicamente, los lípidos microalgales son valorizados en la producción de biodiesel y los carbohidratos en la producción de etanol. Sin embargo, hasta el momento no existen alternativas para la valorización de la fracción proteica de microalgas más allá de alimentos para animales. Es por eso que, el objetivo de esta tesis fue estudiar el pretratamiento con ultrasonido u ozono de biomasa de microalgas cultivada en agua residual con fines de biorrefinería de multiproductos, para llevar a cabo la valorización de las fracciones de proteínas y fósforo.

# OBJETIVOS E HIPÓTESIS



---

## 2. Objetivos e hipótesis

---

### **Objetivo General:**

Diseño de un pretratamiento con ultrasonido u ozono para la recuperación en tándem de lípidos, proteínas, carbohidratos y fósforo, con el fin de valorizar las fracciones de proteínas y fósforo presentes en la biomasa de dos consorcios de microalgas cultivadas en agua residual doméstica.

### **Objetivos específicos:**

- Determinar el proceso de pretratamiento, ultrasonido u ozono, más eficiente en la disrupción celular y recuperación en tándem de lípidos, proteínas y carbohidratos de biomasa de microalgas.
- Determinar el efecto del pretratamiento, ultrasonido u ozono, en la estructura, propiedades térmicas y fisicoquímicas de las proteínas recuperadas, para determinar los parámetros de obtención de bioplásticos mediante moldeo por inyección.
- Obtener un biocomposito con base en biomasa residual de microalgas pretratada con ultrasonido u ozono y policaprolactona (PCL).
- Obtener membranas de nanofibras por electrohilado, con base en proteínas de biomasa de microalgas pretratada con ultrasonido u ozono.
- Determinar el efecto del pretratamiento, ultrasonido u ozono, en la liberación del fósforo contenido en la biomasa de microalgas, mediante la cuantificación de ortofosfatos y fósforo total en cada uno de las fracciones extraídas, para evaluar su recuperación.
- Diseño de un pretratamiento secuencial con ultrasonido y ozono para la recuperación en tándem de lípidos, proteínas, carbohidratos y fósforo.

### **Hipótesis:**

Los procesos de ultrasonido y ozono son eficientes en el pretratamiento de biomasa de microalgas para la recuperación en tándem de biocomponentes microalgales, y producen un efecto positivo en las proteínas y el fósforo contenidos para ser valorizados mediante la producción de un bioplástico y un fertilizante, respectivamente.

# MARCO TEÓRICO

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1 Microalgas

Las algas son un grupo muy diverso de organismos fotosintéticos, predominantemente acuáticos, que representan casi el 50% de la fotosíntesis que tiene lugar en la tierra, en la que el CO<sub>2</sub> y la energía solar son transformados en glucosa [16]. En la actualidad, se ha estimado que existen alrededor de 200,000 - 800,000 de especies, de los cuales unas 35,000 especies ya se han descrito en la literatura [17]. Los estudios indican que la fijación de dióxido de carbono en las algas es mayor de una a dos órdenes de magnitud que la fijación de las plantas terrestres [18]. Por lo tanto, se considera que juegan un papel vital en el ciclo global del carbono, debido a la eliminación del exceso de dióxido de carbono en el medio ambiente, ya que requieren 1.8 kg de CO<sub>2</sub> por kg de biomasa seca [10].

Las microalgas se han reconocido como un recurso prometedor en la producción de biocombustibles, debido a su conversión eficiente de la energía solar en energía química. La biomasa microalgal es capaz de producir mucho más rendimiento de ácidos grasos por área de medio de cultivo que otros sustratos agrícolas como el maíz y la soja, que contienen entre 10-50% de lípidos por peso seco, y no compiten por los recursos convencionales para producir productos agrícolas [19]. Numerosas especies de microalgas contienen una considerable cantidad de proteínas que poseen mejor calidad que las proteínas de verduras, arroz y trigo.

Las ventajas del cultivo de microalgas como recurso de biomasa son [20]:

- Las algas son consideradas un sistema biológico muy eficiente para la recolección de energía solar para la producción de compuestos orgánicos. Se estima que la productividad de biomasa de microalgas podría ser 50 veces mayor que la de los pastizales.
- Las algas son plantas no vasculares, generalmente carecen de órganos reproductivos complejos.
- Muchas especies de algas pueden ser inducidas a producir concentraciones particularmente altas de compuestos comercialmente valiosos, tales como las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y los pigmentos.
- Son microorganismos que sufren un ciclo simple de división celular.
- Se puede cultivar con agua marina, salobre o residual.
- Los sistemas de producción de biomasa de algas pueden adaptarse fácilmente a diversos niveles de capacidad operativa o tecnológica.

#### 3.1.1 Composición bioquímica y estructura de las microalgas

Con propósito de obtener un beneficio a partir de la producción de biomasa de microalgas, es necesario conocer la composición bioquímica de la especie a cultivar. Esto permite evaluar los posibles beneficios a obtener así como también desarrollar metodologías para mejorar la eficiencia de producción de algún componente en particular.

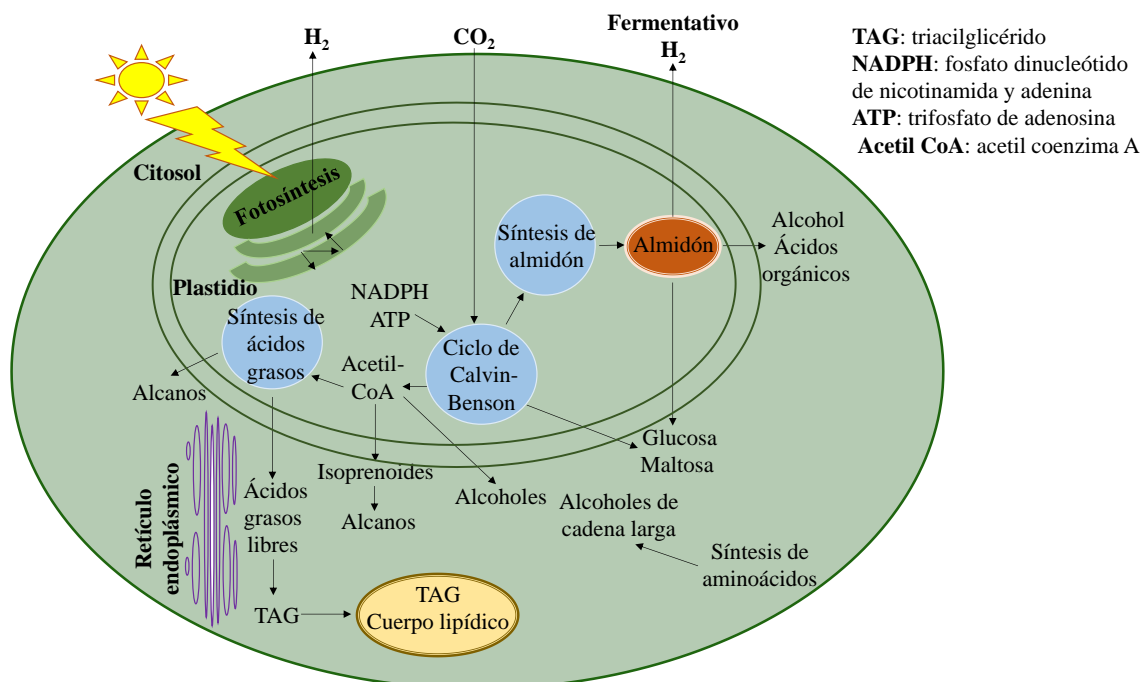
En la Tabla 1 se muestra el contenido aproximado de lípidos, proteínas y carbohidratos de varias especies de microalgas.

### 3. Marco Teórico

**Tabla 1.** Composición aproximada de varias especies de microalgas.

Especie	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12-14	50-55	10-15
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9	40	12
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16-40	8-18	21-52
<i>Chlorella vulgaris</i>	14-22	51-58	12-17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2	57	26
<i>Spirogyra sp.</i>	11-21	6-20	33-64
<i>Desmodesmus sp.</i>	8	49	4
<i>Dunaliella bioculata</i>	8	49	4
<i>Dunaliella salina</i>	6	57	32
<i>Euglena gracilis</i>	14-20	39-61	14-18
<i>Prymnesium parvum</i>	22-38	28-45	25-33
<i>Tetraselmis maculata</i>	3	52	15
<i>Porphyridium cruentum</i>	9-14	28-39	40-57
<i>Spirulina plantesis</i>	4-9	46-63	8-14
<i>Spirulina maxima</i>	6-7	60-71	13-16
<i>Synechococcus sp.</i>	11	63	15

Para poder aplicar la biomasa de microalgas como un recurso sostenible, es de vital importancia conocer la composición y arquitectura de la pared celular y células de microalgas. Conocer la estructura de las células permite maximizar la recuperación de los bioproductos para aumentar su biodisponibilidad. La recuperación de biocomponentes de biomasa de microalgas depende en gran medida de la estructura de la pared celular, así como del tamaño y la forma de las células la microalga. En la Figura 1 se muestra la estructura de la célula microalgal.



**Figura 1.** Estructura de la célula microalgal [imagen modificada de 21].

#### 3.1.1.1 Pared celular

La pared celular de las microalgas consiste en una estructura de polisacáridos fibrilares que están incrustado en una matriz compuesta de polisacáridos neutros y cargados, diversas proteínas y, en algunos casos, polifenoles como la lignina [22]. Aunque la composición específica del polímero de la matriz puede variar, parece bastante claro que el diseño es el de una matriz reforzada. Los polímeros en la misma son tejidos incorporados e interconectados en redes estrechamente reguladas por factores genéticos y medioambientales.

#### 3.1.1.2 Lípidos

En las células microalgales, los lípidos pueden encontrarse dentro de las células como lípidos de almacenamiento (lípidos neutros o no polares) o bien en la membrana como lípidos estructurales (lípidos polares). Los lípidos neutros tienen estructura de un éster triple donde habitualmente tres ácidos grasos de cadena larga están acoplados a una molécula de glicerol. Los lípidos estructurales típicamente tienen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, que también son nutrientes esenciales para animales acuáticos y humanos. Bajo condiciones ambientales desfavorables, muchas microalgas alteran su actividad biosintética hacia la formación y acumulación de lípidos neutros (20-50%), principalmente la forma de triglicéridos (TAG), deseables para la producción de biodiesel [23]. Las TAG generalmente sirven como almacenamiento de energía que en las microalgas se perciben en forma de gotitas de lípidos intracelulares que se forman en el citosol y/o en el cloroplasto [24]. Los lípidos polares y los esteroides son importantes componentes de membranas celulares; se encuentran en forma de glicerol, fosfolípidos y glicolípidos; su principal función es actuar como una barrera selectiva permeable para células y orgánulos [25].

Los ácidos grasos son una variedad de ácidos monobásicos tales como palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3). Pueden clasificarse como ácidos de cadena mediana (C10-C14), cadena larga (C16-C18), ácidos grasos de cadena muy larga (>C20) y derivados de ácidos grasos [26].

#### 3.1.1.3 Proteínas

Según las estadísticas, el rendimiento proteico de las microalgas es de entre 4–15 toneladas/Ha/año. En general, son tres las especies de microalgas con un mayor valor comercial: *Chlorella* con 55% de contenido proteico [27], *Spirulina* (Arthrospira) con 65% de contenido de proteína y *Dunaliella tertiolecta* con un contenido de proteína del 61% [28]. Las microalgas también contienen una gran cantidad de amino ácidos como isoleucina, valina, lisina, triptófano, metionina, treonina e histidina que son comparables o más grandes en comparación con fuentes ricas en proteínas como los huevos y la soja [29].

Las proteínas dentro de la célula microalgal se pueden encontrar tanto en forma libre o bien enlazadas a un pigmento. Muchos pigmentos fotosintéticos de microalgas han sido bien caracterizados y algunos de ellos se utilizan para aplicaciones comerciales. Las más ampliamente utilizadas son las ficobiliproteínas [30]. Mientras que los polisacáridos dominan la arquitectura de la pared celular de las microalgas, las proteínas, especialmente las formas altamente glicosiladas, son también constituyentes comunes e importantes. Las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, también llamadas extensinas, han sido las proteínas más frecuentemente encontradas en la pared celular de las microalgas. Las extensinas se autoensamblan para formar andamios en la pared

celular, ayudan al mantenimiento de la estructura de la pared, mejoran la resistencia a la tracción y contribuyen a la formación de placas y participación en respuestas de defensa [31].

#### 3.1.1.4 Carbohidratos

La acumulación de carbohidratos dentro de las microalgas es principalmente debido a la fijación de carbono durante el proceso de fotosíntesis [32]. Los carbohidratos son normalmente almacenados en la capa externa de la pared celular, la composición de la pared celular externa varía de una especie a otra, pero contiene polisacáridos específicos, tales como pectina, agar y alginato. La pared celular de las microalgas consiste principalmente de una pared celular interna y una capa externa y se pueden agrupar en tres tipos:

- Con una capa exterior trilaminar,
- Con una monocapa externa delgada
- Sin capa exterior

La capa interna de la pared celular de las microalgas se compone principalmente de celulosa y otros materiales como hemicelulosa y glicoproteínas [33]. Para algunas microalgas, los polímeros de glucosa producidos a través de celulosa/almidón son el componente predominante en las paredes celulares y los productos almacenados dentro de la microalga [34]. Mientras que la celulosa y otros polisacáridos fibrosos representan la estructura de la pared celular, otros polímeros forman una matriz que es necesaria para regular las funciones de la pared celular incluyendo la expansión celular, defensa, adhesión y absorción. En las microalgas, las hemicelulosas (por ejemplo, xilanos, xiloglucanos, mananos) y las pectinas dominan la matriz de la pared, sin embargo, se ha demostrado que al menos algunos de estos polímeros de la matriz junto con las proteínas de la pared celular forman extensos módulos macromoleculares que están directamente vinculados entre ellos [35]. Las microalgas se consideran una materia prima prometedora para la producción de bioetanol porque tienen paredes celulósicas y acumulaciones de almidón como la principal fuente de carbohidratos. Tanto el almidón como la mayoría de los polisacáridos de pared celular pueden convertirse en azúcares fermentables para la posterior producción de bioetanol [18].

Hoy en día, la biomasa microalgal se extrae de hábitats naturales o es obtenida a través de un cultivo más o menos controlado [36], los sistemas de cultivo abiertos son los principales sistemas utilizados para producir microalgas, ya que son sistemas más económicos para el cultivo a gran escala, son baratos de construir y operar [37]. Adicionalmente, las aguas residuales enriquecidas con nutrientes tales como nitrógeno y/o fósforo se pueden utilizar como un medio de cultivo, negando así la necesidad de fertilizantes derivados de combustibles fósiles. Además la absorción de nutrientes por las microalgas para la acumulación de biomasa es una forma de tratamiento del agua residual [27].

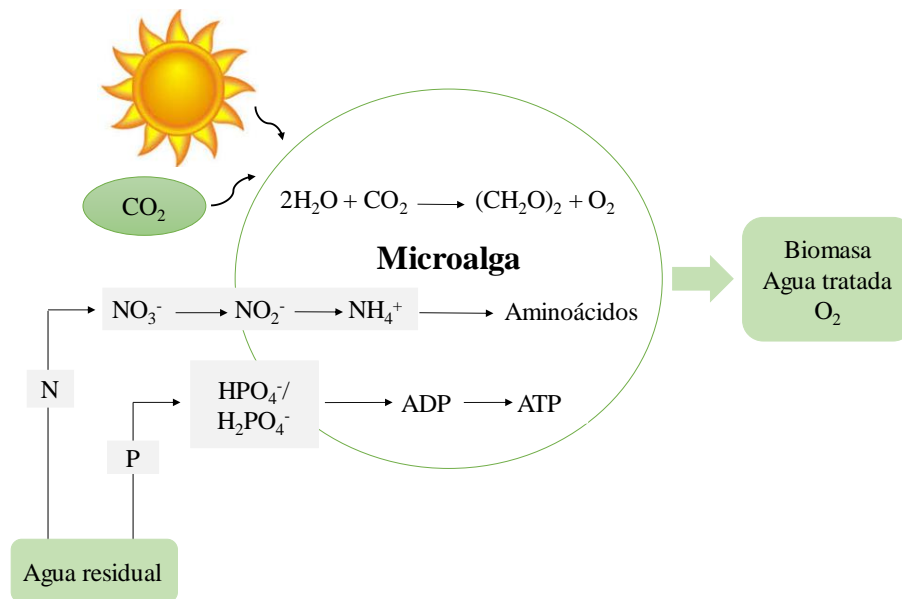
#### 3.2 Fitorremediación

Las plantas de tratamiento de aguas residuales típicas equipadas con procesos de tratamiento secundario son capaces de cumplir con los niveles de carbono orgánico (cuantificado en la demanda bioquímica de oxígeno, DBO) que son necesarios para ser descargados, pero no cumplen con los niveles de descarga para N y P [38]. Para poder cumplir con los límites de descarga para N y P es necesario añadir sistemas de tratamiento terciario para tratar el efluente secundario. La eliminación biológica de nutrientes es una de las opciones para llevar a cabo el tratamiento terciario

### 3. Marco Teórico

de las aguas residuales urbanas, donde el nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) se convierte en gas nitrógeno y el fósforo es recuperado en la biomasa, sin embargo, los procesos de eliminación biológica de nutrientes requieren una alta cantidad de energía [39]. Por ejemplo, en una planta que procesa  $0.24 \text{ m}^3/\text{s}$ , el consumo de energía medido para la aireación tiene un promedio de  $1.48 \text{ kWh/kg}$  de DBO;  $13.44 \text{ kWh}$  para la eliminación total del nitrógeno y  $6.44 \text{ kWh}$  para la eliminación total de P [40]. Además de la demanda de energía, se genera gran cantidad de subproductos. El proceso tradicional de lodos activados para la eliminación de DBO normalmente genera  $0.45 \text{ kg}$  de biomasa por  $\text{kg}$  de DBO eliminada, la eliminación de estos residuos contribuye en casi el 50% del costo de operación de una planta de tratamiento. Las tecnologías de tratamiento de aguas residuales se consideran, por lo tanto, insostenibles. Reconociendo estas preocupaciones, muchos investigadores han tratado de desarrollar tecnologías energéticamente eficientes y sostenibles que puedan minimizar o evitar el consumo de energía y evitar la generación de subproductos [41, 42].

El cultivo de microalgas en agua residual ofrece una solución a los tratamientos terciarios, debido a la capacidad de las microalgas para utilizar nitrógeno y fósforo inorgánico para su crecimiento, así como su capacidad para eliminar los metales pesados y algunos compuestos tóxicos orgánicos. Por otro lado no da lugar a contaminación secundaria como en el caso de la precipitación química, producen oxígeno y tienen un efecto desinfectante debido al aumento en el pH durante la fotosíntesis, en donde se da lugar a la conversión de la energía solar en biomasa útiles, Figura 2 [43].



**Figura 2.** Proceso de cultivo de biomasa de microalgas en agua residual [21].

Durante el tratamiento de aguas residuales, el cultivo de microalgas se usa para una gama de propósitos, dentro de los que se encuentran la eliminación de coliformes, bacterias y de la demanda química y bioquímica de oxígeno. Los sistemas de microalgas pueden tratar aguas residuales humanas, residuos ganaderos, residuos agroindustriales y desechos industriales [43]. Los requisitos necesarios para el crecimiento de biomasa de microalgas son luz, temperatura, pH adecuados y la disponibilidad de nutrientes principales, tales como carbono, nitrógeno, fósforo y

micronutrientes que pueden ser costosos si tienen que ser añadidos en grandes cantidades, lo que puede reducir el costo de la producción de algas al minimizar la adición de nutrientes. Además, el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y de forma simultánea la producción de biocombustibles o fertilizantes también se justifica al disminuir los altos costos de tratamiento [44]. Diversos grupos de investigación y desarrollo están trabajando actualmente en varios aspectos de los sistemas basados en microalgas con el doble propósito de tratamiento de aguas residuales y la producción de energía. Dado que las aguas residuales urbanas en sí contienen energía interna de  $6.3 \times 10^6$  kJ/L, parece lógico cosechar esta energía en lugar de gastar energía para disiparla [45].

#### 3.3 Bioenergía a partir de microalgas

La bioenergía es reconocida como un componente significativo en muchos escenarios del futuro energético, la sustitución de los combustibles fósiles por biocombustibles aparece como una estrategia efectiva, no solo para satisfacer la futura demanda energética, sino también los requerimientos en la reducción de emisiones de carbono de los combustibles fósiles. Además del uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, la biomasa de microalgas demostró ser una importante fuente de lípidos, proteínas y carbohidratos adecuados para la producción de bioenergía. Generalmente, el uso primario que se le da a la biomasa de microalgas es la obtención de biodiesel, que consiste típicamente en una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos obtenidos por transesterificación utilizando alcohol y un catalizador (base o ácido), normalmente se componen de 90-98% de triglicéridos, pequeños niveles de mono- y diglicéridos, ácidos grasos libres y cantidades residuales de fosfolípidos, fosfáticos, carotenos, tocoferoles, compuestos de azufre y agua [46].

La producción de etanol a partir de biomasa microalgal se obtiene principalmente a través de la fermentación de su almidón, azúcar y celulosa. En el caso de microalgas, el contenido de hidratos de carbono asciende de un 70 a un 72% [47], con contenidos de almidón de hasta 60% en peso seco, dependiendo de las condiciones de cultivo [48]. El etanol tiene un octanaje más alto que la gasolina y pueden ser mezclados en cualquier porcentaje para ser utilizados en motores a gasolina como un reemplazo. Sin embargo, esta cualidad del combustible puede ser explotado sólo si los motores se ajustan correctamente, la mayoría de los automóviles de combustión interna pueden funcionar con mezclas de hasta 15% de bioetanol con gasolina. El contenido de oxígeno del etanol también conduce a una mayor eficiencia, lo que resulta en un proceso de combustión más limpio a temperaturas relativamente bajas [49].

La producción de biogás a través de digestión anaerobia ofrece ventajas significativas sobre otras formas de producción de bioenergía. Ha sido evaluada como una de las tecnologías más eficientes desde el punto de vista energético [50]. La generación de biogás puede reducir drásticamente la generación de gases de efecto invernadero, en comparación con los combustibles fósiles [51]. Reijnders y Huijbregts informaron que el metano presenta el mayor valor de calentamiento en comparación con los combustibles de transporte más comunes [52]. La biomasa de microalgas es un sustrato adecuado para la digestión anaerobia, debido a que la composición mineral de las células se ajusta a la demanda de nutrientes de las bacterias anaeróbicas [53]. Las microalgas contienen oligo-nutrientes como hierro, cobalto y zinc que estimulan la metanogénesis [54], además liberan menos sulfuro de hidrógeno que otros sustratos, debido a su bajo cantidad de aminoácidos sulfurados [53]. El proceso de digestión anaerobia implica una comunidad diversa de



bacterias que pueden actuar como una unidad metabólica integrada para producir metano (~ 60%) y dióxido de carbono (~30%) por medio de una serie de reacciones secuenciales y concurrentes. El proceso biológico envuelve cuatro etapas principales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis [55].

#### 3.4 Biorrefinería

En un mundo en continuo desarrollo, el sistema industrial necesita sostener la creciente población de la tierra. Es reconocido que el sistema industrial actual genera productos y servicios que no son sostenibles, además, la eficiencia de producción es <10%, mientras que el 90% de los recursos materiales utilizados en la producción actual de productos son desechados como residuos con alto impacto en el ambiente. Aunado a esto, los cambios climáticos requieren minimización de las emisiones de gases de efecto invernadero utilizando nuevas tecnologías [56]. Esta presión sobre la biocapacidad del planeta, el cambio sin precedentes en el clima y la tendencia del agotamiento de los combustibles fósiles invitan a evaluar las maneras de producir y procesar los recursos humanos de manera eficiente y sostenible para un desarrollo respetuoso con el medio ambiente [57].

La biomasa es considerada ambientalmente sostenible, ya que se puede obtener a partir de derivados de residuos industriales y urbanos. La biorrefinería de biomasa integra la producción de alimentos, productos químicos, materiales, combustibles y energía gracias al desarrollo de tecnologías para el procesamiento de materias primas biogénicas [58], abarca una amplia gama de tecnologías capaces de separar los recursos de biomasa (madera, hierbas, maíz, microalgas...) en sus componentes fundamentales (carbohidratos, proteínas, triglicéridos ...) que pueden convertirse en productos de valor añadido, biocombustibles y productos químicos. Este concepto es análogo a la refinería de petróleo actual que produce combustibles múltiples y productos del petróleo [59].

Los productos de los sistemas de biorrefinería son denominados productos de base biológica, incluyen tres categorías: biocombustibles, bioenergía y productos químicos. Los biocombustibles derivados de biomasa deben ser capaces de reemplazar los combustibles fósiles convencionales principalmente la gasolina, el diésel, el petróleo pesado, el carbón, el gas natural y los productos derivados de la refinería de petróleo. En cuanto a las sustancias químicas, estas pueden ser producidas a partir de biomasa o bien producir una molécula que tengan una función equivalente a la deseada. Los productos energéticos más importantes que se pueden obtener a partir de la biorrefinería son [60]:

- Biocombustibles gaseosos: biogás, gas de síntesis, hidrógeno y biometano.
- Biocombustibles sólidos: pellets, lignina y carbón vegetal.
- Biocombustibles líquidos: bioetanol, biodiesel, combustibles FT y bioaceite.

Los productos químicos y materiales más importantes son los siguientes:

- Productos químicos: bloques de construcción y productos químicos a granel.
- Ácidos orgánicos: succínicos, lácticos y otros derivados.
- Polímeros y resinas: plásticos con base en almidón, resinas fenólicas, furanos y resinas.
- Biomateriales: paneles de madera, pulpa, papel y celulosa.
- Alimentos para ganado y acuicultura.
- Fertilizantes [60].

### 3. Marco Teórico

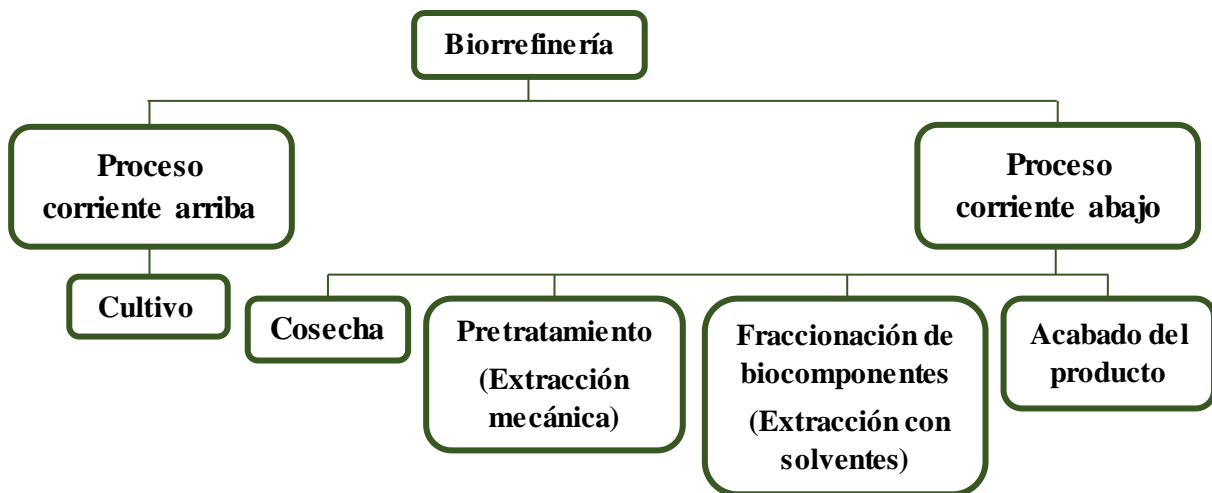
Una biorrefinería, de una manera similar a lo que ocurre en la refinería de petróleo, debe basarse en un proceso de mejora continua, en el que la materia prima sea valorada. Esto significa que una biorrefinería debe separar todos los componentes de la biomasa a través de una cadena de procesos. Como consecuencia, una materia prima no puede ser directamente refinada sin ningún tratamiento previo, ya que su objetivo es aumentar el valor de los diferentes componentes de la biomasa. Este concepto conduce a las siguientes observaciones:

Una biorrefinería debe producir al menos un producto químico/material, además de productos de bajo y alto volumen (como alimentos para ganado y fertilizantes), producir al menos un producto energético calor, electricidad o bien un biocombustible líquido, sólido o gaseoso [60].

Una planta de biorrefinería también debería aspirar a trabajar de manera sustentable: todas las necesidades energéticas del proceso de conversión de biomasa deben ser suministrados internamente, de manera similar los desechos sólidos, líquidos y gaseosos deben ser minimizados. Este objetivo puede lograrse de dos maneras: utilizando todos los diferentes componentes para producir un amplio espectro de productos múltiples en un solo lugar, o la creación de "bio-clusters" industriales. Intercambios de flujos de materiales entre diferentes plantas para transformar un residuo en materia prima [60].

#### 3.5 Biorrefinería de microalgas

Aunque las microalgas son una materia prima prometedora para la producción de biocombustibles, la producción a escala industrial de biocombustibles con base en microalgas todavía es distante. Para mejorar la viabilidad económica del uso de microalgas en procesos a gran escala, todos los componentes de la biomasa (lípidos, proteínas, carbohidratos, pigmentos y fósforo, entre otros) deben ser valorizados, lo que requiere un proceso de biorrefinería. Sin embargo, este concepto sigue siendo demasiado caro. Con el propósito de disminuir el costo de la biorrefinería de microalgas, el proceso se ha dividido en dos etapas para su estudio. Las etapas principales de la biorrefinería de microalgas son: proceso corriente arriba y proceso corriente abajo, Figura 3 [61].



**Figura 3.** Diagrama de flujo del proceso de biorrefinería de biomasa de microalgas.

El proceso corriente arriba está enfocado principalmente al cultivo de microalgas y envuelve la selección de especies de microalgas y las condiciones de cultivo como temperatura, pH, intensidad de luz y disponibilidad de nutrientes. La temperatura es un factor importante para apoyar el

crecimiento de cualquier microorganismo, ya que afecta los procesos bioquímicos celulares. Las variaciones de temperatura afectan la absorción de nutrientes, capacidad de adsorción de dióxido de carbono y la capacidad de captura de fotones. La acidez o basicidad de un medio de cultivo puede afectar el crecimiento y distribución de especies de algas; puede correlacionarse con la temperatura y la disolución de oxígeno e influye en el crecimiento de algas [61]. La alternancia de pH en el medio de cultivo puede afectar la tasa de fotosíntesis y la actividad enzimática que luego puede impactar en la tasa de acumulación de lípidos [62]. La intensidad de la luz tiene un enorme impacto en la tasa de crecimiento celular, ya que la luz es la principal fuente de energía para conducir la fotosíntesis. La ausencia de luz reduce la tasa de fotosíntesis y reduce así la conversión de energía solar en compuestos de energía química tales como trifosfato de adenosina (ATP) y fosfato dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) para apoyar el crecimiento celular [63]. Sin embargo, el exceso de intensidad de luz puede causar daños a células y clorofila. Por último, un medio de cultivo adecuado definitivamente ayuda a maximizar la ingesta de nutrientes para cada especie de microalgas, y si se combina adecuadamente con otros parámetros del proceso, como la temperatura, el pH y la intensidad de la luz, el crecimiento de microalgas puede maximizarse [64].

El proceso corriente abajo se compone de múltiples procesos secuenciales, entre los cuales se encuentran: cosecha, disrupción celular, extracción de los biocomponentes de interés, purificación y acabado del producto [65]. Representa alrededor del 60% del costo total de la producción de biocombustibles con base en biomasa de microalgas y la secuencia de procesos a llevar a cabo dependerá de la naturaleza de la pared celular de las cepas de microalgas [66].

#### 3.5.1 Cosecha

La cosecha de microalgas es un campo que se está desarrollando rápidamente. Diferentes técnicas innovadoras se han propuesto para cosechar microalgas de sistemas diluidos. La cosecha de microalgas de sistemas diluidos mediante centrifugación es un proceso costoso y de alto consumo energético [67]. En algunos casos, la centrifugación representa entre el 20-25% del costo total del proceso de biorrefinería [68], y por lo tanto, es preferible usar tecnologías de cosecha de bajo costo como la floculación [67]. Se han desarrollado de manera exitosa diferentes técnicas de floculación para cosechar microalgas cultivadas en agua dulce y marina. Ejemplos son la adición de floculantes inorgánicos, polímeros catiónicos, biofloculantes, floculantes reciclables y más recientemente, el uso de nanopartículas [69]. Un inconveniente general de tales floculantes es que se pueden encontrar residuos en la biomasa cosechada así como en el medio clarificado. Si los floculantes no son de grado alimenticio, la presencia de estos compuestos unidos a las células de microalgas reducirá considerablemente el valor de la biomasa cosechada.

Otra tecnología convencional para la cosecha de microalgas es la microfiltración. Actualmente, el consumo de energía del proceso de microfiltración puede ser sustancialmente inferior a  $1 \text{ kWh/m}^3$  [70]. Bilad y colaboradores [71] informaron el uso de membranas sumergidas para la cosecha exitosa de microalgas, con un gasto de energía de solo  $0.27\text{--}0.41 \text{ kWh/m}^3$  ( $0.64\text{--}1.32 \text{ kWh/kg}$  de biomasa seca). Gerardo y colaboradores [70] pudieron concentrar biomasa de una concentración inicial de  $0.5 \text{ g/L}$  a una concentración de  $150 \text{ g/L}$  en un solo paso, mediante microfiltración usando solo  $0.8\text{--}3 \text{ kWh/kg}$  de biomasa seca. La investigación en procesos de cosecha de microalgas es necesaria porque el conocimiento existente sobre las técnicas de cosecha individuales es escaso. Sin embargo, es importante darse cuenta de que una tecnología de cosecha particular puede

funcionar de manera diferente para diferentes especies de microalgas [72]. Cuando los avances actuales en la cosecha de microalgas se vuelven integrales y coherentes, la selección racional de una técnica de cosecha adecuada será posible. Esto implica no solo aspectos como el método de cultivo y la especie de microalgas sino también aspectos biológicos específicos de la cepa de microalgas, como la presencia de polímeros/matrices extracelulares.

#### 3.5.2 Pretratamiento

La disrupción celular de las microalgas es un requisito previo para llevar a cabo una biorrefinación, porque la pared celular y la membrana de las microalgas constituyen una barrera para la liberación de compuestos intracelulares. El pretratamiento de la biomasa microalgal constituye una operación clave en la obtención del máximo potencial de los recursos. La evolución de los bioprocesos ha presentado desafíos que requieren un mayor desarrollo de las operaciones de disrupción celular. Específicamente, la capacidad de proporcionar la liberación del producto selectivamente, minimizar el requerimiento de energía, ayudar a manipular la suspensión de células, optimizar la recuperación de biocomponentes y su purificación.

La disrupción celular debe realizarse, preferiblemente, en condiciones moderadas. Estas condiciones son necesarias para mantener la estructura nativa de los biocomponentes celulares individuales [73], ya que el resultado del proceso de pretratamiento afecta la extracción y fraccionamiento de los biocomponentes microalgales y su conversión en productos. Cuando se usan condiciones severas de tratamiento en procesos químicos como pH bajo/alto o altas temperaturas pueden tener un efecto negativo [74].

Para el diseño de sistemas de disrupción celular y la predicción de su rendimiento es necesario entender la ubicación del producto deseado en relación con la pared celular, el efecto de las fuerzas de fluido, fuerzas fisicoquímicas y las propiedades del material de la pared celular. Las células microalgales, se componen generalmente, de una o más membranas y una pared celular estructural. La pared celular es una estructura de polisacáridos reticulados que proporciona resistencia [75], además del mantenimiento de la forma celular y su protección, la pared celular estabiliza la presión osmótica dentro de la célula y regula la permeabilidad con respecto a macromoléculas.

En la recuperación de productos periplasmáticos o asociados a la pared celular no se requiere la rotura completa de la pared, mientras que cuando el producto es citoplasmático, es necesario romper la pared celular. Para la extracción de estructuras citoplásmicas solubles, es suficiente con generar puntos de quiebre, mientras que la liberación de inclusiones granulares o grandes moléculas tales como DNA se requiere la irrupción completa de la pared celular. Cuando el producto se encuentra en un orgánulo, también se requiere la irrupción de estas subestructuras [76]. La elección de un proceso de pretratamiento en una biorrefinería de microalgas es altamente dependiente del tamaño, la composición de la pared y la estructura de sus células [77, 78]. Algunas especies de algas contienen una estructura de pared celular multicapa que tiene alta resistencia a la disrupción química y biológica [79]. Por otro lado, existen especies de microalgas que no tienen pared celular. Por lo tanto, son cultivos más propensos a los ataques químicos y biológicos [80]. Los procesos de pretratamiento pueden clasificarse en térmicos, mecánicos, químicos y biológicos o, de forma más general, en mecánicos o no mecánicos. En la Figura 4 se muestra esta clasificación [81].

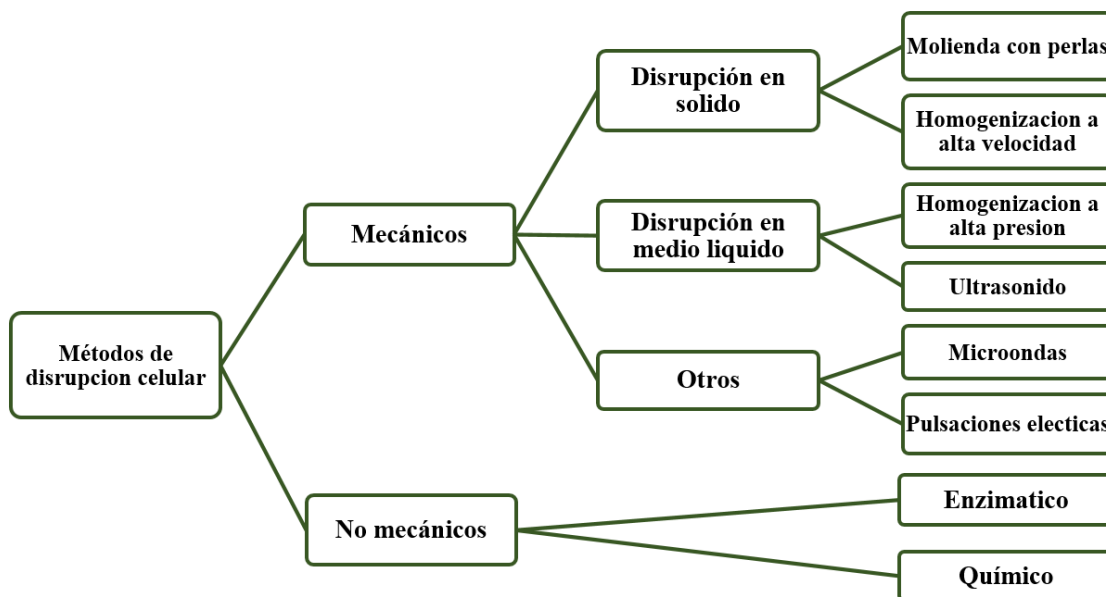


Figura 4. Clasificación de los métodos de disrupción celular.

#### 3.5.2.1 Métodos de disrupción celular mecánicos

Los procesos de disrupción mecánica incluyen prensado, molienda con perlas, ultrasonido, autoclave y homogeneización. Estas tecnologías requieren uso intensivo de energía y tienen mejor funcionalidad cuando se tiene alta densidad celular ( $50\text{-}200\text{ kg/m}^3$ ) [82]. Para mejorar la extracción de los compuestos deseados, estos métodos se utilizan a menudo en combinación con disolventes o bien pretratamientos ácidos/alcalinos y enzimáticos, para obtener mejor recuperación [83]. Sin embargo en general se prefiere una disrupción mecánica de las células, ya que esto ofrece un enfoque que evita contaminación química de la preparación de algas preservando al mismo tiempo la mayor parte de la funcionalidad del material celular [84].

#### 3.5.2.2 Métodos de disrupción celular no mecánicos

Existen componentes microalgales como pigmentos y lípidos que pueden extraerse fácilmente por medio de productos químicos, solventes, calefacción, calentamiento por microondas, congelación, enzimas y osmosis. Sin embargo, también se ha observado que el uso de un método de disrupción celular mecánica ayuda en la extracción de estos componentes, lo que al mismo tiempo provoca una disminución en el uso de productos químicos [85].

#### 3.5.2.3 Ultrasonido

El ultrasonido es la energía emitida por las ondas de sonido con frecuencias por encima del oído humano. Existen dos aplicaciones principales del ultrasonido en bioprocesos, el ultrasonido de baja intensidad usa frecuencias muy altas, del orden de  $2\text{-}20\text{ MHz}$ , con bajos niveles de potencia de  $0.1\text{-}1\text{ W/cm}^2$ . Tiene aplicaciones no invasivas, como la formación de imágenes y el análisis en algunos productos industriales como la composición, madurez, eficiencia de emulsificación y la concentración o dispersión de material particulado dentro de un fluido. El ultrasonido de alta potencia utiliza frecuencias más bajas, normalmente en el intervalo de  $20\text{ a }100\text{ kHz}$  y puede producir niveles de potencias mucho más altos del orden de  $10\text{-}1000\text{ W/cm}^2$ ; se aplica para alterar

las características del material, aumentar las tasas de procesamiento e inactivar microorganismos y enzimas. Tiene suficiente energía para romper enlaces intermoleculares, generará efectos de cavitación, que se sabe puede irrumpir algunos sistemas físicos así como mejorar o modificar muchas reacciones químicas [86].

Cuando se aplica ultrasonido a un líquido, hay dos mecanismos principales por los cuales las células u otras estructuras pueden ser alterados: cavitación y la transmisión acústica. La funcionalidad del ultrasonido habita en la creación de cavitación en la pared celular, la cavitación se produce cuando las burbujas de vapor de un líquido forman un área donde la presión del líquido es inferior a su presión de vapor. Estas burbujas crecen cuando la presión es negativa y se comprimen bajo presión positiva [87]. Las microburbujas crecen y colapsan violentamente, la implosión genera una onda de choque con la energía necesaria para perturbar las membranas celulares e incluso romper los enlaces covalentes. La temperatura y la presión en el interior de las burbujas pueden aumentar hasta aproximadamente 5000 K y varios cientos de atmósferas [88]. Estas condiciones extremas resultan en la disrupción celular, lo que libera o facilita la extracción del material intracelular. Algunos puntos, tales como las características de la pared celular de las especies (espesor, composición y rigidez) pueden contribuir a la eficacia de esta tecnología [89].

Otro posible mecanismo para la inactivación de células es la formación de radicales libres y que pueden o no ser beneficiosos. En la sonólisis del agua, se pueden producir radicales  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}^\bullet$  y peróxido de hidrógeno, se piensa que los radicales hidroxilos atacan los puentes de hidrógeno, lo que conlleva a mayores efectos de fragmentación [86].

#### 3.5.2.4 Efecto del ultrasonido en microorganismos

Las células difieren en su sensibilidad al tratamiento de ultrasonido. Ha sido demostrado que, en general, las células más grandes son más sensibles al ultrasonido. Esto puede ser debido al hecho de que las células más grandes tienen mayor superficie, por lo que son más susceptibles a ser alcanzadas por la alta presión producida durante la cavitación, haciéndolas más vulnerables al tratamiento de sonicación. También se ha investigado la forma celular y se ha encontrado que las células cocoides son más resistentes al tratamiento con ultrasonidos que las células tubulares. Se ha encontrado que las células vegetativas son más resistentes a la sonicación y se sabe que muchos de los microorganismos que son resistente al calor son igualmente resistentes al ultrasonido [86].

#### 3.5.2.5 Pretratamiento de biomasa microalgal con ultrasonido

Se ha demostrado que el ultrasonido mejora la solubilidad de sustrato de microalgas. La sonicación de biomasa utilizando ultrasonido a una resonancia de 10 kHz durante 5 min tiene eficiencia similar que al usar métodos como molienda con perlas o choque osmótico en la extracción de lípidos de *Scenedesmus sp.* Sin embargo, su eficiencia era inferior que al usar microondas [78].

Mason y colaboradores [90] estudiaron la liberación de proteínas hidrosolubles de biomasa de microalgas pretratada con ultrasonido. La máxima concentración de proteína se liberó después de 30 min de ultrasonicación, la concentración de proteínas hidrosolubles en la fase acuosa siguió la misma tendencia que la hidrólisis química, pero con una menor cantidad de proteínas liberadas (9% por peso seco después en 25 min). La presencia de pigmentos en la solución indicó que el tratamiento provocó pequeñas cavidades producidas en la pared celular, así como en el cloroplasto, lo que permitió a algunos pigmentos penetrar a través de la membrana celular. Así mismo se estudió la extracción de pigmentos celulares como la clorofila. Estos pigmentos son liberados en

el medio acuoso con componentes de la membrana celular durante la lisis de la célula y permanecen allí incluso después de la centrifugación a 14.000 g [90]. El proceso de sonicación utilizado en este estudio no solamente tuvo efecto en la lisis celular y del orgánulo, sino también en la dispersión de las pequeñas partículas de restos celulares. La presencia de color verde en el sobrenadante después de la centrifugación es un indicador de pigmentos de clorofila en suspensión, con otros restos celulares que fueron reducidos en tamaño por el proceso de sonicación, hasta el punto donde no podrían ser precipitados en el pellet durante la centrifugación [84].

#### 3.5.2.6 Ozono

El ozono es un agente oxidante fuerte ( $O_3$ ), que se ha utilizado para eliminar el sabor, el olor, el color y para controlar el crecimiento biológico en las plantas de tratamiento de agua. Puede oxidar dobles enlaces y anillos aromáticos ricos en electrones a compuestos como cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos. El ozono puede reaccionar con la materia orgánica en el agua a través de dos vías: ataque directo del ozono molecular y acción indirecta del ozono a través de una variedad de radicales de alta potencia oxidativa, que pueden actuar como oxidantes secundarios. En la primera vía de oxidación, el ataque directo del ozono es seguido por una sustitución aromática electrófila y se somete a reacciones muy selectivas. La segunda vía de oxidación es menos selectiva que la primera y se ve facilitada por la acción de especies radicales. Esos radicales se generan a partir de la descomposición del ozono, como los radicales hidroxilo y conducen a reacciones rápidas con compuestos orgánicos [91]. Nguyen y colaboradores [92] reportaron que la preoxidación de microalgas por ozono puede inducir la lisis celular y, por lo tanto, la liberación de materia orgánica intracelular y facilitar la extracción de lípidos y proteínas de las microalgas [92].

#### 3.5.2.7 Pretratamiento de biomasa microalgal con ozono

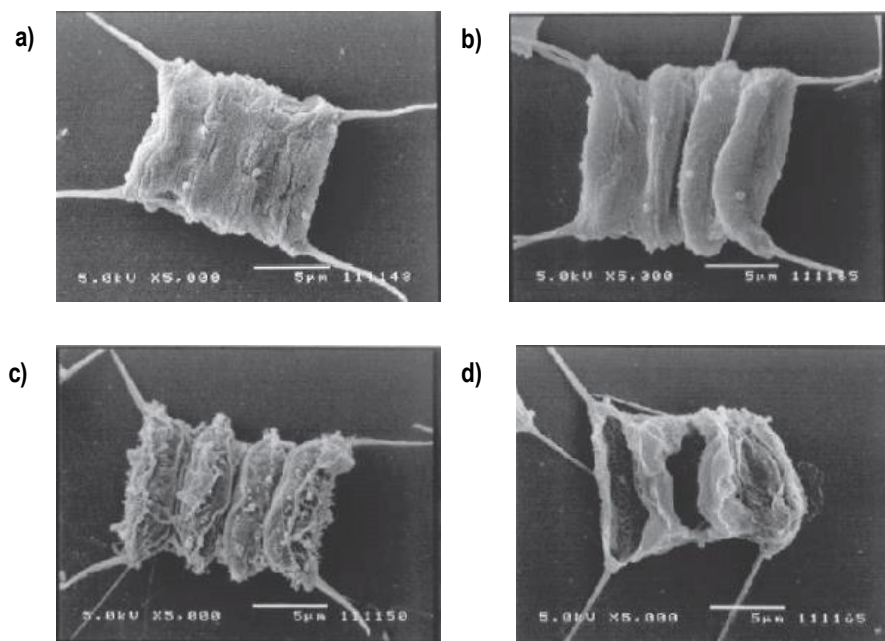
La literatura en el uso de ozono como pretratamiento para inducir la lisis celular es limitada. Sin embargo, el concepto de combinar las propiedades oxidantes del ozono con el proceso de flotación ya ha sido aplicado reportando la remoción de biomasa microalgal, sólidos totales disueltos y coliformes totales de un efluente de agua residual, a través de la lisis celular, por efecto del ozono y la liberación de proteínas que funcionan como agente surfactante [93].

Durante el proceso de ozono-flotación, la disrupción de la pared celular de las microalgas es fuertemente dependiente de la dosis de ozono y de las reacciones de competencia que se dan con la materia orgánica presente [94]. Por otra parte se observó que a dosis de 0.12 a 0.23 mg de  $O_3$ /mg de biomasa seca se recuperan el doble de lípidos microalgales, en comparación con técnicas como centrifugación. Sin embargo, durante el proceso también se puede llegar a la oxidación de lípidos y carbohidratos, debido a un exceso de ozono o la sobre exposición [95]. Por lo cual es preciso encontrar la dosis de ozono adecuada para provocar la lisis en las células microalgales, sin la necesidad de que se tengan pérdidas importantes de los componentes extracelulares.

Plummer y Edzwald [96] obtuvieron fotomicrografías (MEB) de *Scenedesmus quadricauda* antes y después de la oxidación con ozono, para estudiar las características de la pared celular y demostrar el efecto del ozono en la estructura celular. Los estudios se llevaron a cabo con muestras de microalgas de 100,000 células/mL, y se pusieron en contacto con distintas dosis de ozono por 30 min. En las fotomicrografías se observa que, a una dosis de 1 mg de  $O_3$ /L, no existe evidencia de lisis, sin embargo, la capa reticulada se encuentra doblada de una manera más flexible. A dosis de 3 mg de  $O_3$ /L se observaron alteraciones graves, la capa reticulada es separada de las espiguillas

### 3. Marco Teórico

y tanto las espiguillas como la vaina trilaminar (que encierra cada célula individual) son fácilmente visibles, una pequeña fracción de las células se lisaron a esta dosis intermedia de ozono. A dosis altas de ozono (8 mg de O<sub>3</sub>/L) se produjeron grandes daños incluyendo la separación de la capa reticulada y espiguillas, además de la perforación de la pared celular, Figura 5. Sin embargo, también es importante señalar que las muestras utilizadas en este estudio eran cultivos puros y, por lo tanto, no había demanda de oxígeno de materia orgánica distinta a las células [96].



**Figura 5.** Fotomicrografías electrónicas de barrido de *Scenedesmus quadricauda* (100 000 células/ml) antes y después de la oxidación: (a) Sin ozono, (b) 1 mg de O<sub>3</sub>/L, (c) 3 mg de O<sub>3</sub>/L, (d) 8 mg de O<sub>3</sub>/L ozono, barra de escala 5 micras.

Dávila [97] estudió el efecto del ozono como pretratamiento en la hidrólisis ácida y la obtención de azúcares fermentables de *Scenedesmus obliquus*. En una primera etapa se estudió la ozono-flotación como método de cosecha y la liberación de carbohidratos durante el tratamiento; se analizó el contenido de carbohidratos totales en el agua residual sometida a ozono-flotación, encontrando un aumento en la concentración de carbohidratos totales en el sobrenadante de ozono-flotación. Los resultados indican que a dosis de ozono de 31.2 mg/L durante 15 minutos se tiene una pérdida del 23.5%, lo cual se puede atribuir a posibles causas de oxidación [96]. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Nguyen y colaboradores [92], quienes encontraron que los polisacáridos en el sobrenadante se incrementan con el tiempo de ozono-flotación, debido a la lisis celular causada por el ozono [96].

Así mismo, Chen y colaboradores [32] indican que el contenido de polisacáridos aumenta, alcanza un punto máximo y disminuye a medida que la dosis de ozono aumenta; lo cual es posible y dependiente de las condiciones de ozono-flotación. Cardeña y colaboradores [98] estudiaron la aplicación de ozono como un pretratamiento en la producción de metano, la producción más alta de metano (432.7 mL CH<sub>4</sub>/g VS<sub>algal</sub>) se obtuvo con un cultivo compuesto de 35% de *Scenedesmus*, 30% *Dictyosphaerium*, 15% *Keratococcus*, 10% *Oscillatoria*, 8% *Monoraphidium* y 2% *Nitzschia*, usando la dosis de ozono más alta (382 mg de O<sub>3</sub>/ g VS) como pretratamiento [98].



#### 3.5.3 Fraccionamiento de biocomponentes microalgales

El fraccionamiento de biomasa de microalgas es un proceso para separar los biocomponentes deseados de los desechos e impurezas. El fraccionamiento de los biocomponentes se lleva a cabo en función del tamaño del producto, solubilidad, fuerza iónica y volatilidad [99]. Recientemente ha habido un mayor interés en las tecnologías de separación de biocomponentes microalgales como resultado del rápido desarrollo en la producción de microalgas. Hay varios métodos prometedores de extracción y separación de biocomponentes microalgales bajo investigación en este momento; dentro de estos métodos se encuentra la extracción con el uso de líquidos iónicos y tensoactivos, el objetivo principal es separar todas las fracciones sin perder ningún producto [61].

##### 3.5.3.1 Extracción de lípidos

La extracción de lípidos es el proceso central en la producción de biodiesel a partir de microalgas. Los dos métodos de extracción con solventes más ampliamente utilizados son el método Folch y el método Bligh y Dyer. El método de Folch consiste en el uso de cloroformo-metanol (en relación de volumen de 2:1). Este método necesita equilibrar la concentración de células microalgales con un cuarto volumen de solución salina [100]. Por otro lado, el método Bligh y Dyer se lleva a cabo utilizando cloroformo y metanol 1:2 (v/v) [101]. Sin embargo la recuperación y purificación de lípidos a partir de células microalgales continúa siendo un importante cuello de botella en la producción de biodiesel, debido a los altos costos involucrados y el alta demanda de energía. Por lo tanto, hay una considerable necesidad de desarrollar un método de extracción que cumpla con los requisitos esenciales de ser seguro, rentable, eficiente, selectivo, ambientalmente amigable, factible para la producción a gran escala y libre de generación de productos contaminantes [61].

El uso de concentrados de biomasa de microalgas en base húmeda como materia prima para la extracción de lípidos es especialmente deseable, ya que evita el proceso de secado. Esto ahorraría costos considerables y eludiría al menos dos procesos largos durante la producción de biodiesel con base en biomasa de microalgas. Por definición, la extracción de lípidos de la biomasa de microalgas húmeda consiste en alterar/dañar las paredes celulares de las microalgas en la solución en la que se cultivaron para después llevar a cabo la extracción de lípidos. En las técnicas de extracción de lípidos de biomasa húmeda de microalgas, el agua actúa como una barrera entre los lípidos intracelulares y los disolventes orgánicos no polares. El aumento en la polaridad del solvente así como en la eficiencia de disrupción celular puede eliminar este obstáculo en gran medida, ya que las técnicas de ruptura de células microalgales liberan cuerpos lipídicos que posteriormente pueden ser recuperados [102].

##### 3.5.3.2 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas generalmente se logra después de la disrupción celular. Las proteínas microalgales se extraen convencionalmente mediante métodos acuosos, ácidos y alcalinos, seguidos de varias rondas de centrifugación y recuperación utilizando técnicas como ultrafiltración, precipitación, o cromatografía [103]. Los métodos de extracción química, como tratamientos con ácidos y álcalis en dos fases, han sido especialmente eficientes para extraer proteínas, ya que la extracción de proteínas a pH mayores a 10 produce que los agregados de proteínas sean solubilizado y liberados, lo que resulta en un rendimiento de extracción de entre el 70% al 95% por ciento [104]. Sin embargo, el proceso de extracción de proteínas de microalga puede verse influenciada por la disponibilidad de las moléculas de proteína en la célula microalgal,

debido a que la extracción de proteína puede verse obstaculizada por la alta viscosidad aniónica de la matriz de polisacáridos presentes en la pared celular [105].

#### 3.5.3.3 Sacarificación de carbohidratos

La sacarificación suele ser el paso limitante en la producción de biocombustibles utilizando biomasa microalgal que contiene una fuente de celulosa. Se sabe que la celulosa y el almidón son los dos principales carbohidratos que contiene la biomasa de microalgas. Por lo tanto, para mejorar la utilización de carbohidratos, es importante identificar métodos eficientes para la división de los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos entre las subunidades de hidroglicosa en las moléculas de celulosa, y la división de los enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos en almidón. Si bien el proceso de sacarificación de microalgas es similar al de los materiales lignocelulósicos, la falta de lignina presente en la biomasa de microalgas simplifica el proceso de pretratamiento [107]. Se han aplicado varios métodos para producir azúcares a partir de microalgas, como ácidos minerales, alcalinos, enzimas o agua caliente comprimida [108], y se pueden clasificar en dos grupos principales, la sacarificación enzimática y la sacarificación química.

Los procesos de sacarificación enzimática, que implican el uso de celulasas, amilasas y glucoamilasas, se usan ampliamente para hidrolizar biomasa de microalgas y obtener azúcares. La celulosa contenida en la biomasa de microalgas se encuentra principalmente en la pared celular interna mientras que la lignina está ausente mientras que el contenido de hemicelulosa es muy bajo. Por lo tanto, las enzimas de degradación de lignina (por ejemplo, lacasa y la peroxidasa de lignina) y la xilanasas pueden no ser necesarias en el proceso de sacarificación enzimática. Además, tampoco es necesario un pretratamiento fuerte, como un pretratamiento ácido o alcalino, o una explosión de vapor, lo que hace más fácil y más barato sacarificar la celulosa con base en microalgas, en comparación con los materiales lignocelulósicos [109]. La hidrólisis enzimática tiene varias ventajas sobre la hidrólisis química (como la hidrólisis ácida o alcalina), incluidos equipos de bajo costo, ya que la hidrólisis se lleva a cabo en condiciones suaves y con mayores rendimientos de glucosa, sin la producción de subproductos de degradación del azúcar o tóxicos que pueden afectar el proceso de fermentación para la producción de biocombustibles [110].

El proceso de sacarificación química se caracteriza por su reacción rápida, pero generalmente requiere condiciones de reacción violentas (mayor temperatura, presión y adición de ácido o álcali), lo que resulta en la producción de inhibidores como furfural y 5-hidroximetilfurfural. La producción de estos subproductos potencialmente reprime el proceso de fermentación para la producción de biocombustibles y también requieren un costoso tratamiento de los residuos generados [111]. Mantener condiciones de reacción adecuadas (incluyendo temperatura, contenido de humedad, tiempo de residencia y concentración del agente de reacción) es esencial para reducir la producción de inhibidores y mejorar la eficiencia operativa. Debido al corto tiempo de hidrólisis requerido, la hidrólisis ácida/alcalina se ha aplicado con éxito a la producción de azúcar a partir de microalgas. En particular, dado que la celulosa presente en las microalgas no está asociada con la lignina, la hidrólisis química se puede llevar a cabo en condiciones no intensivas (es decir, baja concentración de ácido o álcali, baja temperatura de reacción, etc.) [112].

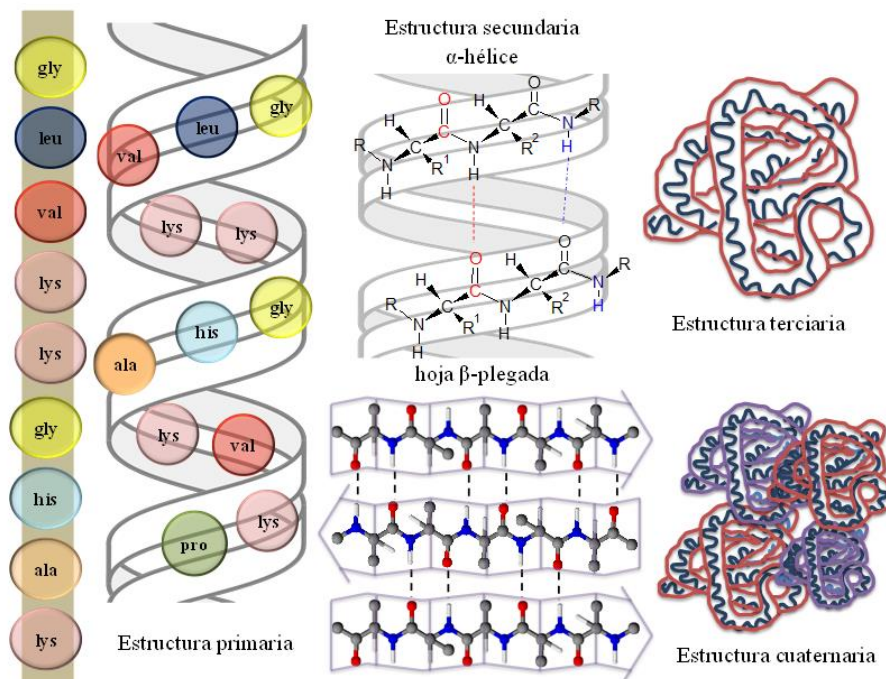
#### 3.6 Valorización de proteínas

Las proteínas son heteropolímeros de aminoácidos, la unidad de repetición, que es el aminoácido, contiene por lo menos dos átomos de carbono así como nitrógeno y difieren sólo en sus grupos

### 3. Marco Teórico

funcionales laterales [113]. Desde una perspectiva bioquímica, la estructura de la proteína es definida en cuatro niveles. La estructura primaria es la secuencia de aminoácidos que componen la cadena de proteína. La estructura secundaria son segmentos de cadena que forman estructuras regulares como  $\alpha$ -hélices u hojas  $\beta$ -plegadas. La estructura terciaria es el plegado de la cadena en una compleja forma tridimensional. La estructura cuaternaria son múltiples cadenas que interactúan para formar estructuras más grandes. En solución, en condiciones biológicas, las proteínas se encuentran en un típico auto-ensamble, un estado plegado estabilizado por disolventes e interacciones proteína-proteína, donde estas interacciones específicas son más fuertes que las interacciones proteína-solvente [114].

La conformación nativa de las proteínas es estabilizada mediante una serie de interacciones con diferentes fuerzas de enlace incluyendo puentes de hidrógeno (4-29 kJ/mol), fuerzas electrostáticas (25.4 kJ/mol), interacciones hidrofóbicas (8-13 kJ/mol) y efectos de solvatación. La conformación nativa de las proteínas no es una estructura rígida fija, como tampoco lo son los procesos de relajación donde el sistema se mueve hacia el equilibrio desde un estado de no equilibrio, las proteínas experimentan equilibrio de fluctuación incluso en un estado estable cambian entre múltiples sustratos conformacionales, Figura 6 [115].



**Figura 6.** Estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de proteínas.

Aunque la estructura “cristalina” de miles de proteínas ha sido resuelta por cristalografía de macromoléculas de rayos X, tales estructuras son realmente el promedio de la posición de los átomos en las moléculas que se someten a fluctuaciones rápidas en solución [115]. Las proteínas se mueven en formas muy dinámicas y son flexibles en una amplia gama de escalas de tiempo y distancia [116].

#### 3.6.1 Productos y propiedades de proteínas microalgales

Los productos proteicos que se pueden obtener de microalgas se clasifican basados en su contenido de proteínas y el grado de refinación como proteína de células enteras, concentrados de proteínas, aislados, hidrolizados y péptidos bioactivos. Las proteínas en las células tienen la estructura celular y el tejido intacto y generalmente se consume directamente (células de microalgas enteras). Las células de microalgas contienen entre 40–50% de proteína, pero los porcentajes varían basados en especies y condiciones de crecimiento. Para obtener productos con alto contenido proteico (60–89% de proteína por peso seco) como concentrados, aislados, hidrolizados y péptidos bioactivos, las proteínas deben extraerse de las células de microalgas y concentrarse. En relación con la aplicación, los ingredientes proteicos también se clasifican basados en su valor nutracéutico y propiedades funcionales. El valor nutracéutico de un producto proteico está relacionado con la salud y con beneficios nutricionales que el producto puede proporcionar como la digestibilidad, el contenido de aminoácidos esenciales y la bioactividad. Estos últimos son propiedades deseadas en la mayoría de las aplicaciones alimentarias, especialmente al formular alimentos fortificados, batidos nutricionales y bebidas deportivas [117].

Las propiedades funcionales de las proteínas, por otro lado, contribuyen a propiedades físicas de productos alimenticios y cosméticos. Las propiedades más comunes son la capacidad de emulsificación y la capacidad espumante. Estas propiedades son determinadas por la estructura de la proteína y las interacciones proteína-proteína así como la interacción de proteínas con otras moléculas en solución [118]. La capacidad de emulsificación se refiere a la capacidad de las proteínas de retener aceites así como la estabilidad de las emulsiones aceite-proteína. La capacidad de espumación se refiere a la flexibilidad de la proteína que permite la reducción de tensión superficial, para mantener las burbujas de aire en suspensión. La capacidad de formar espuma es una propiedad deseada en cremas y productos para untar, entre otros [117].

El alto contenido de proteínas de las algas también puede ser beneficioso para su uso como alimento de animales de granja y mascotas, así como en la acuicultura. Se estima que aproximadamente el 30% de la producción mundial de microalgas es utilizado para alimentación animal, con un 50% de biomasa de *Spirulina* en particular como suplemento alimenticio, debido a su excelente perfil nutricional [119]. Varias especies de microalgas, incluidas *Spirulina*, *Chlorella*, y *Schizochytrium sp.*, se pueden incorporar como fuentes de proteína en las dietas de aves de corral, cerdos, vacas, ovejas y conejos [120]. El uso de microalgas como fuente de alimento animal tiene cuatro principales beneficios, como la resistencia al stress, la mejora del sistema inmunológico, el aumento de la productividad/calidad y la reducción de microorganismos patógenos en el producto final [121]. Estos beneficios se han observado en varias especies, incluidas especies monogástricas y de rumiantes cuando se encuentran en niveles del 2% del alimento diario [122].

Por otra parte las proteínas se encuentran entre los recursos biológicos más prometedores para la producción de bioplásticos, ya que los materiales basados en proteínas tienden a formar redes macromoleculares tridimensionales, estabilizadas y reforzadas por enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro [123]. La fabricación de bioplásticos con base en proteínas implica, como primera etapa, la desnaturalización de proteínas inducida por vía química, térmica o por presión. Debido a la diversidad en el ensamblaje de las redes de proteínas y a sus estructuras únicas, se puede producir una gran variedad de materiales biodegradables, que ofrecen una amplia gama de propiedades funcionales [113].

#### 3.6.2 Obtención de bioplásticos con base en proteínas

Los materiales con base en proteínas son redes macromoleculares más o menos ordenadas con bajo contenido de humedad, estabilizadas y reforzadas por enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro. La probabilidad de formar enlaces intermoleculares depende de la forma de las proteínas. Es decir, de la longitud de la cadena, la relación con su diámetro y de las condiciones durante la fabricación [124]. La formación de una red macromolecular a partir de proteínas requiere de tres pasos principales:

1. La ruptura de enlaces intermoleculares de baja energía que estabilizan al biopolímero en su estado nativo y aumentan la movilidad de las cadenas poliméricas, lo que modifica la estructura tridimensional de las proteínas [125].
2. Organización y orientación de las cadenas de polímero móviles en la forma deseada.
3. La formación de nuevos enlaces intermoleculares e interacciones para estabilizar la red tridimensional.

En la actualidad se utilizan una variedad de procesos tecnológicos para elaborar materiales con base en proteínas, entre los cuales se encuentran proceso en húmedo basado en la dispersión o solubilización de las proteínas. Los procesos en seco que se basan en las propiedades termoplásticas de las proteínas bajo condiciones de poca humedad y los proceso de electrohilado que se basan en aplicar suficiente fuerza eléctrica que supere las fuerzas de tensión superficial en una solución viscoelástica de polímero [126].

#### 3.6.3 Obtención de bioplásticos a partir de un proceso termoplástico

Para obtener bioplásticos con base en proteínas mediante un proceso termoplástico se requiere que las cadenas de proteínas estén desnaturalizadas, disociadas y desalineadas. Esto permite que fluyan en presencia de calor, debido a que tienen mayor movilidad y, de este modo, puedan tomar la forma deseada para posteriormente llevar a cabo la formación de nuevas interacciones moleculares al enfriarse. Los sitios activos para la formación de enlaces deben ser libres y lo suficientemente cercanos entre sí para crear enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro, formando una nueva red tridimensional. La movilidad de las cadenas poliméricas se consigue por calentamiento o por la adición de plastificantes, ya que sin plastificantes, las temperaturas requeridas para asegurar la movilidad de las cadenas de proteínas son alrededor de su temperatura de descomposición [113].

El comportamiento termoplástico de las proteínas ha sido estudiado y utilizado para fabricar materiales bajo condiciones de baja humedad, similares a los de los materiales termoplásticos con base en almidón [127]. Aunque los biopolímeros como las proteínas han sido descritos como estructuras amorfas plastificadas por agua, aspectos de la estructura de las proteínas (regiones ordenadas como  $\alpha$ -hélices u hojas  $\beta$ -plegadas) y su comportamiento endotérmico pueden hacerlos parecer materiales semicristalinos [128]. Cuando un material semicristalino se calienta, se somete a una serie de transiciones. La primera es la temperatura de transición vítrea en la que las regiones amorfas se convierten en móviles, seguida de la temperatura de fusión, donde las regiones cristalinas se funden. Por último se llega a la temperatura de degradación del polímero, donde las cadenas se descomponen térmicamente. De manera más formal, las temperaturas de transición son las temperaturas a las cuales las propiedades macroscópicas de las proteínas cambian y esto se describe en términos de movimientos o relajaciones moleculares específicos que se producen en

### 3. Marco Teórico

escalas de tiempo observables, aunque a menudo se describe en términos cinéticos. Analizar estas transiciones y estructuras de las proteínas proporciona información útil sobre cómo procesar las proteínas para obtener materiales termoplásticos [129].

#### 3.6.3.1 Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ )

Las propiedades termoplásticas de las proteínas se definen en relación con la teoría de transición vítrea, que explica los cambios de textura durante el procesado de polimerización [130]. La transición vítrea es un cambio de un estado vítreo metaestable a un estado gomoso inestable, en una temperatura específica, induce variaciones de las propiedades físicas de los materiales y, más particularmente, de sus propiedades térmicas y mecánicas. La respuesta molecular de un material vítreo como un sistema de transformación de un estado vítreo metaestable a un estado gomoso inestable corresponde a un aumento general en el desorden, el volumen libre y la movilidad de las macromoléculas [131].

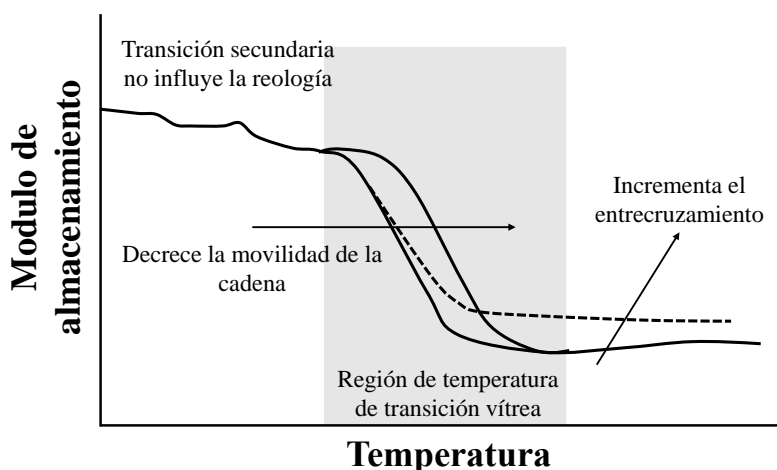
**Tabla 2.** Factores generales que influyen en la transición vítrea de proteínas y la forma en la que se presentan.

Atributo	Forma en la que se presenta en proteínas
Factores que incrementan la temperatura de transición vítrea	
Grupos laterales voluminosos	Residuos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), otros residuos grandes (leucina, isoleucina, metionina, glutamina, lisina, arginina e histidina).
Grupos rígidos	Residuos de prolina, carácter parcial de doble enlace en los enlaces C-N en la mayoría de las cadenas polipeptídicas.
Simetría de la cadena	Poco común en proteínas.
Grupos polares	Sitios de puentes de hidrógeno en la mayoría de los enlaces C=O y N-H, residuos polares (lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico y tirosina).
Enlaces covalentes cruzados	Enlaces disulfuro cruzados de los residuos de cisteína, puentes salinos entre residuos de ácido (ácido aspártico y ácido glutámico) y residuos de bases (lisina, histidina y arginina).
Factores que disminuyen la temperatura de transición vítrea	
Aditivos como plastificantes	Agua u otros plastificantes.
Flexibilidad de grupos principales	Enlaces- $\Phi$ (N- $C_\alpha$ ) y enlaces- $\psi$ (C'- $C_\alpha$ ), aunque hay limitaciones estéricas en las que los ángulos son permitidos.
Asimetría de los grupos laterales	Secuencias en la estructura primaria.
Grupos no polares	Residuos hidrofóbicos (prolina, glicina, fenilalanina, alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina).

### 3. Marco Teórico

Dado que las proteínas contienen grandes cantidades de interacciones intermoleculares con una gran variedad de fuerzas, cualquier tratamiento teórico de su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) debe tomar estas interacciones en cuenta. Mientras que muchos polímeros sintéticos son homopolímeros con una sola unidad de repetición, las proteínas son heteropolímeros con una amplia variedad de grupos laterales que son capaces de interactuar con una variedad de fuerzas. El fenómeno de transición vítrea se ve afectada por las características de las macromoléculas, tales como flexibilidad, longitud de las cadenas, tamaño y polaridad de los grupos laterales, peso molecular, presencia de enlaces covalentes intermoleculares y el contenido de plastificantes, Tabla 2 [132].

Las técnicas más comunes que se utilizan para medir la  $T_g$  de los polímeros incluyen la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis térmico-dinámico-mecánico (DMTA). La  $T_g$  aparece como un escalón en la línea base del DSC, lo que resulta de un cambio en la capacidad calorífica (entalpía), Figura 7 [133].



**Figura 7.** Cambio general en el módulo de almacenamiento de proteínas y polímeros sintéticos con un cambio de temperatura.

Se han estudiado las transiciones vítreas y el comportamiento de relajación de proteínas secas o semisecas, la  $T_g$  de proteínas secas sin plastificante varía dependiendo de la composición de aminoácidos, pero está típicamente en el rango de 120 a 250 °C [134].

Hasta hace poco, no podían ser estudiados los materiales en polvo por técnicas de relajación mecánicas como DMA. Sin embargo, ahora es posible obtenerlos por técnicas calorimétricas, aunque puede ser difícil distinguir la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) si se encuentran demasiado cercanas. Es fácil distinguir la  $T_g$  en proteínas, que ya han perdido parte de su estructura terciaria cuando se tienen bajos contenidos de humedad [135]. Por otra parte, técnicas moduladas de DSC, pueden resolver la superposición de eventos térmicos en proteínas aisladas, utilizando tasas de calefacción oscilante [136].

#### 3.6.3.2 Desnaturalización y temperatura de fusión

La desnaturalización es el proceso de transformación de una proteína a una conformación no nativa, sin embargo, todavía pueden haber estructura residual en su estado nativo, dependiendo de las condiciones, la desnaturalización puede ser reversible o irreversible [137]. Cuando estudiamos la temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) inducida térmicamente por DSC, la  $T_d$  es el pico

endotérmico, en solución, este se produce normalmente por debajo de 100 °C [138]. El punto medio en el pico endotérmico de desnaturalización es a menudo llamado temperatura de fusión de la proteína ( $T_f$ ), por analogía con la fusión de los sólidos. No obstante la  $T_f$  de proteínas también es un caso endotérmico que no se debe equiparar con la temperatura de fusión de los cristales en polímeros sintéticos, ya que la estructura nativa de las proteínas no es una típica conformación rígida, sino una aproximación promedio y estados desnaturalizados todavía pueden ser desplegados [115]. En contraste, la fusión en polímeros se entiende que normalmente implica un cambio de un estado de cadenas alineadas a un estado amorfo móvil [139].

Procesos endotérmicos en seco o con proteínas parcialmente hidratadas también han sido identificados como desnaturalización de proteínas. En tales casos, la  $T_d$  depende del contenido de humedad y aumenta a medida que disminuye el contenido de humedad [138]. Se pueden observar múltiples  $T_d$  si está presente más de una proteína, pero la presencia de dos picos no siempre significa que esté presente más de una proteína, debido a que las proteínas son heteropolímeros complejos con una amplia variedad de interacciones, las diferentes partes de una sola cadena puede responder de manera diferente y contribuir con múltiples eventos térmicos [140].

Los comportamientos de desnaturalización de proteínas en solución y de proteínas secas (o con plastificante) son relevantes para el procesamiento de materiales termoplásticos basados en proteínas. La formación de un artículo de plástico consolidado requiere nuevas interacciones intermoleculares que se formen a expensas de las interacciones intramoleculares existentes en la proteína. Esto implicaría que un plástico consolidado ya no contiene a las proteínas en su estado nativo y que en algunas ocasiones la desnaturalización es necesaria [141]. Los estudios de desnaturalización en solución demostraron que se mantiene un poco de orden después del proceso, la implicación de esto para materiales termoplásticos basados en proteínas es que la estructura secundaria puede permanecer por encima de la  $T_d$  y su presencia puede influir en el comportamiento térmico y las propiedades reológicas.

#### 3.6.3.3 Agregación

La agregación térmica de las proteínas se caracteriza a menudo como un modelo de dos estados: el primero es un despliegue reversible seguido de una agregación irreversible. Se ha argumentado que la agregación no requiere proteínas totalmente desplegadas, simplemente el despliegue de algunas regiones para permitir la formación de nuevas interacciones intermoleculares. Los procesos de agregación son importantes en la obtención de termoplásticos con base en proteínas, debido a que se requieren nuevas interacciones entre las múltiples cadenas poliméricas, para impartir fuerza mecánica después de la consolidación pero la agregación excesiva en la masa fundida puede causar dificultades durante el procesamiento. También puede haber ramificaciones que aumentan la viscosidad, si se produce un aumento en la agregación después de cada ciclo de calentamiento [139]. La estructura primaria de una proteína es la que determina su tendencia a formar enlaces covalentes cruzados, así como su sensibilidad hacia la plastificación o movilidad de la cadena.

#### 3.6.3.4 Degradación

La razón por la que la degradación es importante es que impone límites superiores de temperatura en el procesamiento para termoplásticos. Los cambios en las propiedades mecánicas y el aumento de la solubilidad indican degradación de proteínas. Los principales productos que se forman de la



degradación de proteínas son H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>. Aunque la temperatura óptima de procesamiento depende tanto de la secuencia de aminoácidos de las proteínas como del nivel de plastificación utilizado [113], esta debe estar por encima de la temperatura de ablandamiento pero por debajo de las temperaturas que causan degradación excesiva. Para las proteínas, la temperatura de ablandamiento o fusión es típicamente 40 °C por encima de la T<sub>g</sub> [142]. Las temperaturas típicas del procesamiento de proteínas están en el rango de 70-130 °C.

#### 3.6.4 Plastificante

La temperatura de trabajo durante el proceso de obtención de bioplásticos es un parámetro crítico, ya que la movilidad de las cadenas poliméricas estabilizadas por enlaces de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y los enlaces disulfuro [124] aumentan con un aumento de temperatura, pero las interacciones hidrofóbicas y agregación que siguen a la desnaturalización restringen el movimiento de la cadena [143].

La mayoría de los plásticos sintéticos tienen una T<sub>g</sub> por debajo de 100 °C, mientras que las proteínas con menos de un 5% de contenido de humedad muestran temperaturas de transición vítrea cercanas o por encima de su temperatura de descomposición [144]. Calentamiento adicional por encima de la T<sub>g</sub> por encima del punto de reblandecimiento o por encima de la T<sub>f</sub> se traduce en un material de baja viscosidad que puede ser fácilmente procesado. En consecuencia, el uso de plastificantes u otros aditivos para aumentar la movilidad de la cadena se ha convertido en algo esencial para prevenir la degradación de proteínas y aumentar su procesabilidad [145].

Los plastificantes son moléculas con bajo peso molecular y baja volatilidad que modifican la estructura tridimensional de las proteínas, reducen las fuerzas intermoleculares y aumentan la movilidad de las cadenas poliméricas. Además, reducen la temperatura de transición vítrea del material termoplástico. Los plastificantes son un componente necesario para superar la fragilidad de los materiales con base en proteínas, así como para ayudar a evitar roturas o rasgaduras durante el manejo y almacenamiento posteriores, el agua es el plastificante más común [146].

El agua se considera un plastificante natural y se utiliza ampliamente durante la obtención de bioplásticos con base en proteínas. Su pequeño tamaño le permite maniobrar fácilmente a través de pequeñas aberturas entre cadenas. Cada molécula de plastificante puede interactuar con una cadena de proteína, lo que implica que en fracciones de masa iguales, el agua es normalmente más eficiente que otros plastificantes [142]. El efecto del contenido de humedad en la temperatura de transición vítrea se ha estudiado ampliamente y se encontró que el agua no solo reduce la temperatura de transición vítrea sino también la temperatura a la que las interacciones secundarias entre cadenas poliméricas de proteínas se forman, actúa como un medio de dispersión, plastificante y disolvente, influyendo en la disolución, viscosidad de la mezcla y la deformación de partículas dispersas [144]. El agua tiene un bajo peso molecular y muy baja temperatura de transición vítrea (-135 °C), por lo que es un plastificante muy eficiente para proteínas. En la Tabla 3 se observa el efecto del agua en la reducción de la temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>). El agua entra en la red de proteínas e interactúa con las cadenas laterales fácilmente accesibles de aminoácidos polares mediante puentes de hidrógeno, previniendo así las interacciones proteína-proteína y conduciendo de ese modo a la plastificación.

### 3. Marco Teórico

**Tabla 3.** Efecto del contenido de humedad en la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de diferentes bioplásticos con base en proteínas [113].

Fuente de proteína	$T_g$ en °C al porcentaje de agua							Técnica de análisis
	0	5	10	15	20	25	30	
Harina de gluten de maíz	178	100	70	55	45	40	30	MDSC
Zeína	139	70	40	10	<0			DSC
Caseína	210	140	90	70	50	40	25	DMTA, PTA, DSC
Soya	172	105	80	60	45	35	35	
Gluten de trigo	162	110	65	40	20	18	<18	

Otro plastificante muy común para las proteínas es el glicerol, una molécula pequeña y soluble en agua, que muestra efectos plastificantes similares a los del agua, ya que penetra con facilidad la superficie plegada de la proteína para interactuar con los aminoácidos polares [147]. La diferencia más importante entre el glicerol y el agua es la alta viscosidad del glicerol, que ha demostrado induce disipación viscosa de calor durante la mezcla con gluten de trigo [124]. El glicerol y el agua son plastificantes eficaces, debido a su bajo peso molecular y la capacidad de interactuar con residuos polares en la proteína. No obstante los estudios han observado la migración del plastificante durante el almacenamiento de los plásticos con base en proteínas [148]. En condiciones secas, el agua no unida se evapora fácilmente lo que reduce su efecto plastificante, la baja permanencia de un plastificante en el producto es muy importante, ya que se asegura que las propiedades del material son consistentes a cuando fue producido [149].

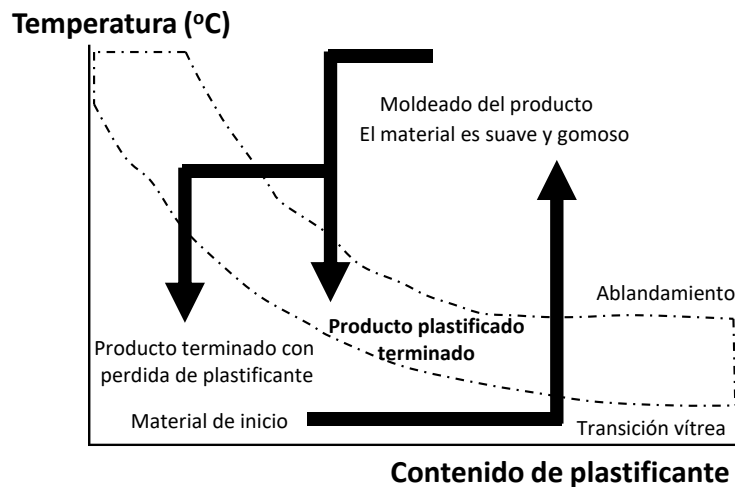
El consenso general es que las interacciones hidrofóbicas gobiernan las asociaciones de cadenas de proteínas durante el moldeo por inyección aunque los plastificantes polares como el glicerol y el agua no son capaces de interactuar con las zonas hidrofóbicas en la cadena polipeptídica. Las zonas hidrófobas sólo serán capaces de interactuar una con otra y no con el plastificante polar, formando densos dominios estructurales envasados [144]. Otras sustancias como los plastificantes anfifílicos tienen una composición química similar a las proteínas, que contienen ambos grupos polares y no polares [150].

Las proteínas se estabilizan principalmente por enlaces de hidrógeno, pero las interacciones hidrofóbicas también juegan un papel importante. Pommet y colaboradores probaron varios plastificantes para la producción de materiales termoplásticos con base en gluten de trigo; se seleccionaron 23 plastificantes y se usaron al 30% en peso para obtener el material. Se encontró que los plastificantes con pocos grupos hidrófilos eran incompatibles con el gluten de trigo y no se formaba un material consolidado, otro resultado interesante que se encontró fue que el ácido láctico tenía la eficiencia más alta como plastificación, mientras que el ácido octanoico fue el menos eficiente, principalmente debido a su hidrofobicidad. El ácido láctico contiene grupos hidroxilo y carboxilo, esto favorece las interacciones con diferentes cadenas laterales de aminoácidos, en comparación con otros plastificantes. Un beneficio adicional de las condiciones ácidas fue la prevención de la formación de enlaces disulfuro, ya que ésta se ve favorecida en condiciones alcalinas [124].

### 3. Marco Teórico

En resumen un plastificante eficiente tendrá un bajo punto de fusión, baja volatilidad y una buena compatibilidad con la proteína. La eficiencia de plastificación es generalmente proporcional a la masa molecular e inversamente proporcional al porcentaje de grupos hidrófilos del plastificante [151]. Un plastificante que funciona para una proteína no necesariamente debe tener éxito con otra proteína, esto debido a la amplia gama de posibles secuencias de aminoácidos. Por esa razón, es importante llevar a cabo investigaciones preliminares para poder designar un plastificante compatible y poder predecir su efecto reológico en la red de proteínas [113].

La Figura 8 ilustra cómo la plastificación y el calentamiento por encima de la temperatura de transición vítrea y el punto de reblandecimiento permitirá que un material se convierta en un producto comercial. El uso de un plastificante reduce la  $T_g$  con el punto de reblandecimiento y cuando el punto de reblandecimiento está por debajo de la temperatura de descomposición, el material debe ser fácilmente procesables. Los plastificantes mejoran la procesabilidad interponiéndose entre las cadenas de polímero y alterando las fuerzas que existen entre ellas [147]. Esto se produce a través de dos mecanismos: lubricación y aumento de volumen libre, reducen los puentes de hidrógeno, Van der Waals o interacciones iónicas a través de la formación de interacciones plastificante-polímero. La cantidad adecuada de plastificante reducirá la necesidad de energía mecánica, lo que resulta en un material menos perturbado y de mejor calidad [152].



**Figura 8.** Representación esquemática de un proceso termoplástico aplicado a un material con base en proteínas.

#### 3.6.5 Moldeado por inyección

Las mezclas de proteínas/plastificantes (bioplásticos) pueden procesarse utilizando las tecnologías existentes que son utilizadas para el procesamiento de plásticos comunes: desde métodos fisicoquímicos, de fundición o termoplásticos/mecánicos (moldeo por compresión o extrusión). De estos procesos, el moldeo por inyección es una de las técnicas de procesamiento de polímeros más versátiles y cada vez más utilizadas [153], el moldeo por inyección es particularmente útil para materiales poliméricos (por ejemplo, proteínas) que se desvían de un comportamiento termoplástico típico. Consiste en un proceso de dos etapas: el primero es un paso de mezcla seguido del moldeo por inyección adecuado. Es importante controlar las condiciones de procesamiento en la etapa mezclada y en el proceso de inyección posterior, seleccionando las

condiciones apropiadas para garantizar una velocidad de inyección óptima, relacionada con la reducción en la velocidad del pistón, esto permite que la masa se inserte en el molde [154]. Dependiendo de las condiciones seleccionadas (por ejemplo, tiempo de mezcla o presión de inyección), los biocompuestos fabricados exhibirían diferentes propiedades (es decir, una alta absorción de agua para ser considerado como materiales absorbentes adecuados) para considerarlos para aplicaciones específicas [155].

#### 3.6.5.1 Etapa de extrusión o mezclado

Casi todos los termoplásticos se procesan por extrusión en alguna etapa de su fabricación. Antes de procesar un bioplástico, es necesario obtener una masa, que es una mezcla de concentrado de proteínas y plastificante o bien, cuando se trata de un compuesto, una mezcla de polímero, plastificante y concentrado proteína o fibra [156]. La etapa de extrusión juega un papel importante en el establecimiento de las propiedades del polímero, ya que el material puede hacerse termoplástico bajo condiciones especiales de calor y cizallamiento.

Como regla general, durante la etapa de mezclado se debe seleccionar un procesamiento moderado. Tal procesamiento incluye un tiempo de residencia corto, configuración moderada de los tornillos, bajas temperaturas de procesamiento y, si es necesario, secado previo de los materiales. De lo contrario, puede ocurrir un daño que produce efectos negativos durante el posterior proceso de moldeo por inyección, debido a la exposición del material al estrés térmico. Por un lado, se requieren largos periodos de mezclado para obtener una masa homogénea pero al mismo tiempo se deben evitar periodos de mezcla excesivamente largos, para evitar estructuras inducidas por cizalla [157].

#### 3.6.5.2 Etapa de moldeo por inyección

El moldeo por inyección es el proceso más utilizado para la producción de termoplásticos, especialmente para aquellos que son de forma compleja y requieren alta precisión dimensional. Es el método de moldeo más utilizado en la industria para la producción de compuestos de polímeros, debido a su simplicidad y su rápido ciclo de procesamiento. La máquina de moldeo por inyección inyecta una cantidad medida de mezcla en el molde dando como resultado el producto deseado. Se compone de tres secciones principales: la unidad de inyección, el molde y la unidad de expulsión y sujeción [158].

La unidad de inyección consiste en un barril calentado que tiene un tornillo de compresión. La función del barril caliente es proporcionar calor a la matriz polimérica, para que se derrita antes de la inyección. La función del tornillo es inyectar la mezcla en el molde cerrado que actúa como un pistón. Las cavidades en el molde son la réplica de la geometría deseada del producto. Los moldes consisten en bobinas de enfriamiento y/o calentamiento para regular la temperatura del molde. La temperatura del molde determina la velocidad de enfriamiento del producto. La unidad de sujeción sujeta firmemente el molde contra la presión de inyección, para evitar la formación de rebabas y la unidad eyectora acciona los expulsores en el molde, para expulsar la pieza cuando se completa el ciclo. Generalmente, el ciclo de moldeo por inyección comienza desde la posición de cierre del molde. Después de que el molde se cierra, la unidad de sujeción lo sujeta firmemente. Mientras tanto, el tornillo se retrae a su posición posterior y luego inyecta la mezcla fundida con la presión de inyección y la velocidad deseadas en la cavidad del molde. La mezcla inyectada se contrae durante la solidificación y para compensar que el tornillo se mantenga hacia adelante se aplica la

presión de retención deseada durante algún tiempo. Después de este punto se permite que la pieza se enfríe lo suficiente, como para poder soportar la fuerza del eyector y cumplir con las dimensiones deseadas. El molde se expulsa y el ciclo se repite [158].

La típica máquina de moldeo por inyección está diseñada para la fabricación de termoplásticos y la misma se utiliza para la fabricación de bioplásticos con base en proteínas sin ningún cambio importante. Como las propiedades de las proteínas naturales obtenidas son diferentes de las propiedades de las fibras sintéticas utilizadas en la fabricación de termoplásticos tradicionales, es necesario comprender los diversos parámetros del proceso de la máquina de moldeo por inyección y sus efectos para lograr los compuestos deseados. Hay varios parámetros de proceso a tener en cuenta durante el moldeo por inyección. La optimización de estos parámetros del proceso conduce a una reducción en el tiempo del ciclo y, como resultado, una reducción en el costo operativo y una mayor productividad. Los parámetros importantes del proceso se identifican como temperatura del cilindro, velocidad de inyección, tiempo de inyección, presión de inyección, temperatura del molde y contrapresión [158].

#### **3.6.5.3 Temperatura de la unidad de inyección**

La temperatura del cilindro de inyección es un parámetro importante del proceso, ya que influye directamente en las propiedades del producto final. La fusión de la matriz polimérica tiene lugar en el cilindro por lo tanto la temperatura de esta zona depende de la temperatura de procesamiento de la matriz utilizada. La temperatura del cilindro debe ajustarse cuidadosamente, ya que la viscosidad de la mezcla se reduce a medida que aumenta la temperatura, pero al mismo tiempo, las temperaturas más altas pueden conducir a la degradación de la matriz [158].

#### **3.6.5.4 Velocidad de inyección**

La velocidad de inyección es un parámetro importante del proceso durante el moldeo por inyección de termoplásticos. Depende de la viscosidad de fusión del polímero y de la carga de mezcla. La velocidad de inyección tiene que incrementarse con el aumento de la viscosidad de la masa fundida, ya que se hace difícil que la mezcla viscosa fluya hacia cavidades delgadas. La alta velocidad de inyección provoca altas velocidades de cizallamiento al pasar por el molde, lo que generalmente reduce la viscosidad de la masa fundida. La velocidad de inyección debería ser más rápida en caso de moldes que tienen una sección transversal delgada o en caso de moldes de múltiples cavidades y se mantiene relativamente más lenta para piezas gruesas [158].

#### **3.6.5.5 Tiempo de inyección**

El tiempo de inyección depende directamente del tiempo en que el material deja de fluir debido a su solidificación en la entrada de la cavidad del molde. El tiempo de inyección consiste en el tiempo de llenado y el tiempo de retención. El tiempo de sellado de la entrada del molde se determina midiendo el peso del producto a intervalos regulares mientras se aumenta el tiempo de inyección hasta que el peso del producto se vuelve constante. Si el tiempo de inyección es menor, significa que la presión de retención se elimina antes de que el material se solidifique, el material en las cavidades del molde volvería a fluir debido a la alta presión en la cavidad del molde que conduce a varios defectos como huecos, hundimientos y desajustes dimensionales. Por lo tanto, para optimizar el tiempo de inyección, el tiempo de retención debe reducirse gradualmente hasta que se logre el tiempo de retención óptimo (hasta la solidificación del material en la entrada del molde) [158].

#### 3.6.5.6 Presión de inyección

La presión de inyección consiste en la presión de llenado y la presión de retención. La presión de llenado durante el moldeo por inyección suele ser mayor que la presión de retención. Debe poder inyectar del 90 al 95% del volumen de inyección en la cavidad del molde. Idealmente, la presión de llenado debería ser la presión máxima que se puede lograr sin molde, pero una presión alta conduciría a mayores tensiones en la pieza moldeada. La presión de mantenimiento es importante para superar la contracción durante la solidificación a baja temperatura del polímero cristalino. La presión de mantenimiento debe establecerse de acuerdo con las propiedades de contracción del material. La alta presión de retención también reduce los defectos de vacío y hundimiento, pero debe regularse cuidadosamente, ya que la alta presión de retención también conduce a la formación de rebabas [158].

#### 3.6.5.7 Temperatura del molde

La temperatura del molde también es un parámetro importante en el proceso de moldeo por inyección. La temperatura del molde se puede regular mediante el uso de calentadores y los canales de enfriamiento provistos en el molde. Las bajas temperaturas del molde se pueden lograr utilizando canales de agua de enfriamiento, que toman continuamente el calor del molde, pero la baja temperatura del molde conduce a un enfriamiento rápido de la parte que resulta en el desarrollo de tensiones residuales. Se desea una temperatura alta del molde para obtener piezas brillantes. Para evitar la deformación, las piezas moldeadas deben enfriarse por debajo de la temperatura de deflexión térmica [158].

#### 3.6.6. Biocompositos

Los biocompositos son sistemas multicomponentes que se constituyen principalmente de polímeros sintéticos y naturales como las proteínas. La mezcla de polímeros naturales o sintéticos es a menudo un medio eficiente y económico para abordar muchos de los problemas que enfrentan los bioplásticos con base en proteínas, incluida la resistencia limitada a la humedad, degradación rápida y desempeño insatisfactorio, particularmente en ambientes húmedos. La mezcla de polímeros ofrece las siguientes ventajas: proporcionar materiales con un conjunto completo de propiedades deseadas a bajo costo; ampliar la aplicación de materiales sintéticos capitalizando el máximo rendimiento posible de la mezcla; mejora propiedades específicas tales como resistencia al impacto o resistencia a solventes, la procesabilidad, uniformidad del producto y reducción de la producción de desechos. En general, las mezclas efectivas pueden proporcionar ventajas sobre los polímeros individuales en términos de procesabilidad, rendimiento y costo [159].

La combinación de proteínas con polímeros termoplásticos biodegradables es particularmente interesante, porque las mezclas resultantes generalmente conservan su biodegradabilidad. Algunos de los polímeros potenciales estudiados que podrían retener la biodegradabilidad de las proteínas y mejorar el rendimiento incluyen poli (adipato de butileno-co-ftalato de butileno) (PBAT), polihidroxi (butirato-co-valerato) (PHBV), poli (succinato de butileno) (PBS), policaprolactona (PCL), poli (ácido láctico) o combinaciones [159]. Sin embargo, el principal problema encontrado al usar polímeros de base biológica es su adhesión interfacial bastante pobre. La pobre adhesividad da como resultado baja resistencia, rigidez relativamente baja y alta absorción de humedad. Una forma de mejorar la mala adhesión es una modificación de la interfase de la matriz y la proteína.

Sin embargo, el pretratamiento de la superficie normalmente aumenta tanto los pasos de procesamiento como su costo [158].

Debido a la facilidad de fabricación, la alta tasa de producción y la alta variabilidad del proceso, el moldeo por inyección se ha utilizado ampliamente en la industria de producción de biocompositos, sin embargo, al procesar biocompositos se debe considerar ajustes al proceso. En particular, de debe tener en cuenta la absorción de humedad de las fibras y la sensibilidad térmica ya que conducen a menores propiedades mecánicas, decoloración, desarrollo de olores y fluctuaciones de procesamiento. Exposición extensa al estrés térmico debe evitarse porque puede producir carbonización en la superficie, lo que a su vez afecta de forma negativa las propiedades mecánicas. Cuando se produce un biocomposito, el material de la matriz debe tener un punto de fusión relativamente bajo, para exponer el polímero natural a la menor cantidad de estrés térmico posible. Los parámetros de procesamiento deben seleccionarse en consecuencia, para que el ciclo y los tiempos de residencia del material sean lo más corto posibles [158].

#### 3.6.7 Propiedades del material obtenido

Las propiedades finales del bioplástico son fuertemente influenciadas por las condiciones de procesamiento y la fuente de proteínas [160]. La solubilidad, absorción de agua, descomposición térmica y las propiedades mecánicas pueden estar relacionadas con las características estructurales de las cadenas de proteína en el producto final [161].

##### 3.6.7.1 Solubilidad

La solubilidad de las proteínas antes y después del procesamiento a menudo se considera como un buen indicador de la formación de interacciones covalentes durante el procesamiento. La solubilidad en agua puede indicar el tipo de interacciones que se formaron durante el proceso en las formas siguientes:

1. Generalmente, el agua sola se puede usar para determinar la fracción total insoluble.
2. Las moléculas de proteínas que están sueltas o no asociadas deben disolverse en sistemas tampón.
3. La disolución en soluciones de dodecil sulfato de sodio (SDS) podría ser indicativo de interacciones hidrofóbicas o electrostáticas entre cadenas de proteínas.
4. Fracciones insolubles en SDS pueden solubilizarse con la adición de reactivos reductores que rompan los enlaces cruzados.

Se han realizados amplias investigaciones de los cambios en la solubilidad en sistemas de proteína en agua a altas temperaturas, así como en soluciones de SDS con agentes reductores. En todos los casos, la solubilidad se reducía cuando la temperatura de calentamiento se incrementó. Se cree que tras el calentamiento se forman enlaces disulfuro y no disulfuro, lo que reduce la solubilidad, sin embargo, la exposición a altas temperaturas y bajos contenidos de humedad provoca un aumento en la solubilidad, que se atribuye a la degradación de proteínas. Por otra parte las proteínas que contienen altas cantidades de cisteína, mantienen su integridad estructural a altas temperaturas, esto se atribuye a la formación de enlaces covalentes cruzados [162].

#### 3.6.7.2 Absorción de agua

La absorción de agua es una prueba cualitativa para el análisis de la densidad reticular de los bioplásticos con base en proteína, que puede ser relacionado con las propiedades mecánicas. No obstante, en algunos casos, la absorción de agua debe ser controlada, independientemente de la densidad reticular, en función del uso previsto de los bioplásticos. Huang y colaboradores investigaron el efecto de la temperatura en las propiedades físicas y mecánicas de bioplásticos con base en mezclas de proteína de soja-almidón, mediante un proceso de moldeo por inyección. En este trabajo se observó que la absorción de agua disminuyó y las propiedades de tracción aumentaron con el aumento de temperatura, hasta 130 °C. La disminución en la absorción de agua y el aumento de las propiedades mecánicas se atribuyó al aumento de las interacciones entre proteínas después del procedimiento. Por encima de 130 °C, la absorción de agua aumentó ligeramente, acompañado por una ligera disminución en la resistencia a la tracción y alargamiento a la rotura, indicativo de la degradación de proteínas [163].

Pommet y colaboradores investigaron el comportamiento de absorción de agua del gluten de trigo extruido, utilizando diversos tipos de plastificantes. El uso de ácido láctico como plastificante causó la desintegración del bioplástico después de la inmersión en agua, debido a la reducción de la agregación y la densidad reticular en condiciones ácidas. La disminución de la absorción de agua se observó para materiales procesados a temperaturas más altas, como resultado de un aumento de la densidad reticular. En cambio, cuando se utiliza ácido octanoico como plastificante, se vio afectada la absorción de agua por el aumento de las temperaturas de procesamiento. La absorción de agua se redujo mediante el uso de un plastificante hidrófobo y el grado de reticulación. Por lo tanto, los plastificantes hidrófobos pueden ser utilizados para reducir la sensibilidad de los materiales al agua. Por lo general, los plastificantes hidrófobos no formarán bioplásticos homogéneos debido a su falta de compatibilidad. Incluso después de hacerlos reaccionar químicamente con la proteína, la eficiencia de plastificación fue baja a pesar de que la reducción de la absorción de agua es un resultado útil [164].

A partir de estos estudios, se puede concluir que la absorción de agua no sólo está influenciada por los enlaces covalentes, sino también por la capacidad de la proteína para interactuar con agua. La exposición de grupos hidrófobos, ya sea por reordenamiento de la cadena o por los aditivos químicos, también puede influir en la absorción de agua. Sin embargo, en ausencia de estos aditivos, es mucho más difícil obtener un buen producto [113].

#### 3.6.7.3 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los polímeros están fuertemente asociadas con la distribución y concentración de las interacciones inter e intra-moleculares permitidas por la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas [126]. La extrusión y otras técnicas de procesamiento térmico dan lugar a reordenamientos y nuevas interacciones, las cuales pueden ser ajustadas con el uso de plastificantes y aditivos químicos. En general, los verdaderos plastificantes aumentarán la flexibilidad e inducirán un incremento en la extensibilidad del producto moldeado. Por otro lado, el aumento de las interacciones moleculares dará lugar a un material con mayor resistencia a la tracción y rigidez. Severas condiciones de procesamiento pueden conducir a la degradación de proteína y afectar adversamente las propiedades mecánicas del material obtenido [113]. La Tabla 4 resume algunas de las propiedades mecánicas de diversos bioplásticos con base en proteínas plastificadas con glicerol o agua.



### 3. Marco Teórico

**Tabla 4.** Propiedades mecánicas de proteínas procesadas mediante un proceso termo-mecánico, plastificadas con agua y glicerol.

Proteína	Contenido de plastificante (%)	Esfuerzo a la tensión (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Elongación (%)
SPI/almidón de maíz (1:1)	11.5 (W:G = 0.3)	2.9–3.9	28–46	69–95
SFPI	4–22 (G) 18 (W)	10.6–16.1	500–2000	0.58–1.8
Almidón – Zeína (4:1)	11.5–12.5 (G) 6.6–8 (W)	22–25		4.7–5.3
SPFI	37 (G) 10.5 (W)	3.2	18	73
SPI/almidón de maíz (1:0.66)	46.4 (G)	3.09	104	45
Suero de proteína	18.4 (G) 15.4 (W)	3.1–4.1	31–47	121–132
Zeína	0–10 (SDS)	17.3–22.4	186–299	11–13

**SPI: Proteína aislada de soya SFPI: Proteína aislada de girasol W: Agua G: Glicerol**

#### 3.7 Electrohilado

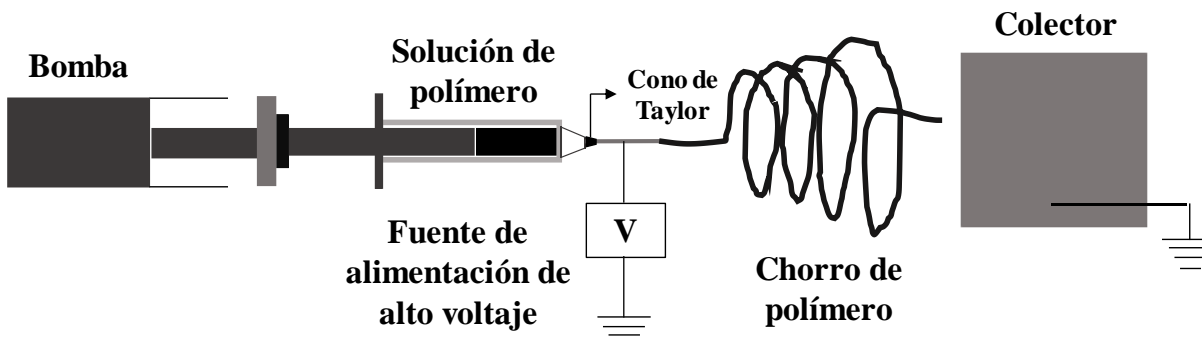
El electrohilado, una variante del hilado por electrostática o electroespreado, es actualmente la única técnica que puede producir fibras ultrafinas continuas de diámetros de micrómetros a nanómetros. El electrohilado es un enfoque para producir fibras a partir de una solución de polímero bajo la influencia de fuerzas electrostáticas. El equipo de electrohilado típico está compuesto por cuatro componentes principales:

1. Fuente de alimentación de CC capaz de suministrar más de 10 kV.
2. Tuvo capilar con hilador (comúnmente una jeringa conectada a una aguja) donde se forma el hilo de fibra.
3. Bomba para suministrar solución de polímero a la jeringa.
4. Colector, que también actúa como contraelectrodo.

En un proceso típico de electrohilado se utiliza alto voltaje para crear un chorro de solución polimérica cargado eléctricamente, que se seca para dejar una fibra polimérica [164]. La solución se alimenta a través de la aguja a una velocidad constante usando una bomba para jeringa. Cuando se aplica alto voltaje, la gota colgante de solución de polímero en la boquilla de la aguja se carga estáticamente y las cargas inducidas son uniformemente distribuidas sobre la superficie [165]. La tensión superficial de la gota normalmente daría como resultado una esfera en equilibrio pero la gota está distorsionada en el campo eléctrico, debido a que las cargas dentro de la gota migran a la superficie del colector. La acumulación de carga provoca una protuberancia que aparece en el extremo de la gota, distorsionando la gota en una forma cónica conocido como el cono de Taylor [166]. Con el incremento en el campo de fuerza, la fuerza electrostática repulsiva supera la tensión superficial y un chorro de fluido cargado se expulsa de la punta del cono de Taylor cuando se alcanza el valor crítico. La solución de

### 3. Marco Teórico

polímero se descarga como un chorro que luego se somete a un proceso de estiramiento y golpeteo (una serie de bucles conectados) lo que lleva a la formación de un hilo largo y fino. A medida que el solvente se evapora, las fibras sólidas de polímero con diámetros que van desde micrómetros a nanómetros, se forman y se colocan sobre una pantalla de metal o tambor colector conectado a tierra, Figura 9 [167].



**Figura 9.** Equipo de electrohilado.

Durante el proceso de electrohilado, la formación de fibras está controlada por los procesos simultáneos de evaporación del solvente y alargamiento de las fibras [168]. Como el disolvente se elimina del polímero en escalas de tiempo inferiores a un segundo, las cadenas moleculares están altamente alineadas, pero generalmente no tienen tiempo suficiente para formar una estructura bien definida a microescala. Como resultado, para polímeros cristalinos o semicristalinos hay un retraso en el proceso de cristalización [169]. La morfología y el diámetro de las fibras electrohiladas dependen de un número de parámetros que incluyen: (a) parámetros de la sustancia, incluyendo las propiedades del propio polímero y las propiedades de la solución intrínseca, como viscosidad (o concentración), conductividad y tensión superficial; y (b) parámetros del proceso [170], incluidas las condiciones de operación (como el potencial eléctrico aplicado y la distancia entre punta y colector) y parámetros ambientales (como temperatura y humedad) [171].

#### 3.7.1 Parámetros asociados a la solución de proteína

Los parámetros asociados a la solución están muy bien documentados en la literatura y se han investigado muchas combinaciones de polímeros y solventes de uso común [172]. La elección de la solución a menudo está dictada por la necesidad de formar fibras de un material dado y, como tal, la solución debe hacerse de modo que los siguientes parámetros sean propicios para el electrohilado:

- Viscosidad
- Conductividad
- Tensión superficial
- Elasticidad

Los métodos que pueden emplearse para alterar las propiedades de la solución son numerosos e incluyen la alteración de la concentración, la elección del disolvente, el peso molecular del polímero y el uso de aditivos.

#### 3.7.1.1 Viscosidad

La viscosidad de la solución depende de la concentración (porcentaje de polímero en solución), el peso molecular del polímero, la temperatura ambiente y la presencia de impurezas en la solución [173]. La viscosidad puede ser alterada ajustando cualquiera de estos parámetros, o si alguno de estos factores debe mantenerse constante, la viscosidad se puede ajustar manipulando condiciones operativas, como la temperatura. Se ha informado que la baja viscosidad de la solución es un factor importante en la formación de cuentas a lo largo de la longitud de la fibra, junto con varios otros parámetros [174]. La capacidad de la solución para fluir está relacionado con qué tan rápido y qué tan lejos pueden moverse las cadenas de polímeros individuales y puede influir en el diámetro de la fibra. Se cree que la creación de perlas a baja viscosidad puede estar relacionada con inconsistencias en la distribución del polímero cuando se mantiene dentro del solvente [175]. El diámetro del cordón y el espaciamiento también están relacionados con el diámetro de la fibra: cuanto más delgada es la fibra, más cercanas están las cuentas entre sí y así mismo menor es el diámetro de las cuentas. Para producir fibras consistentes y llevar a la formación de menos cuentas, la viscosidad de la solución se debe mantener constante.

#### 3.7.1.2 Conductividad

La solución debe ser de naturaleza iónica, para que el campo eléctrico pueda fluir entre la aguja y el colector a través de la solución. Si una solución no es conductora, las fibras pueden no formarse. La conductividad puede ser alterada cambiando el polímero o el solvente, la concentración de la solución, o mediante la adición de aditivos como las sales. Además de la polaridad y carga de las moléculas en solución, la conductividad también se ve afectada por la movilidad iónica, que a su vez puede verse afectada por la viscosidad de la solución. La densidad de carga neta (medida como la cantidad de carga transportada desde la aguja al colector, por volumen de material depositado) está relacionado con la formación de cuentas y el diámetro de la fibra [176].

Por lo general, la conductividad de la solución es difícil de modificar sin alterar otras características de la solución. En estas situaciones puede ser más fácil alterar la intensidad del campo eléctrico, el caudal de la solución u otras propiedades del material para lograr la calidad deseada. Para soluciones con muy baja conductividad, se pueden utilizar aditivos de sal. Estas sales se disocian en iones en solución, aumentando el contenido de iones dentro del chorro de líquido. El uso de grandes cantidades de sales puede causar un aumento en la viscosidad de la solución y también puede afectar la tensión superficial de la solución [177].

#### 3.7.1.3 Constante dieléctrica

Se ha informado que la constante dieléctrica de la solución puede tener un efecto tanto en la velocidad de deposición como en el diámetro de las fibras [178]. Se cree que esto es el resultado de la interacción del campo eléctrico interno creado en un material dieléctrico y el campo eléctrico externo aplicado [175].

#### 3.7.1.4 Tensión superficial

Como factor independiente, la tensión superficial puede ser muy importante, ya que el campo eléctrico necesita superar la tensión superficial en términos de energía, para producir el chorro de solución. La tensión superficial se puede manipular cambiando el material utilizado o mediante la

adición de tensoactivos a la solución [176]. También es un factor muy importante en el rebordeado de la fibra, la solución con una alta tensión superficial favorecerá la formación de cuentas [174]. Las cuentas tienen una mayor relación volumen por área de superficie que una fibra y, al formar cuentas, se reduce la energía superficial del material a medida que se crea menos superficie. Esto es contraproducente para el objetivo común del electrohilado, que es crear una relación muy baja de volumen por área de superficie de fibras. Si la tensión superficial es demasiado alta o si la viscosidad es demasiado baja, la fibra no se formará en absoluto y se crearán gotitas en su lugar en un proceso conocido como electropulverización [179].

#### 3.7.1.5 Elección de solvente

La elección del solvente utilizado en la producción de fibras puede tener un gran impacto en sus propiedades. Los solventes más volátiles se evaporarán más rápido, lo que reducirá la distancia de giro requerida. Diferentes solventes dan como resultado soluciones que contienen polímeros que tienen viscosidades variables, lo que puede influir en la morfología final de las fibras. También se ha demostrado que, para las mismas condiciones de proceso, cambiar el solvente de acetona a hexafluoro-2-propanol (HFIP) puede alterar las propiedades mecánicas de los materiales producidos.

#### 3.7.1.6 Elección de polímeros

A menudo, la elección del polímero está determinada por la aplicación específica de las fibras que se van a producir, ya sea como andamios biodegradables, para tejidos que serán usados como filtros de ingeniería o bien que sean químicamente resistentes. Alterar el peso molecular del polímero puede variar significativamente las propiedades de la fibra. Altos pesos moleculares aumentarán la viscosidad de la solución incluso si la concentración de la solución es constante. El peso molecular del polímero también puede afectar su nivel de disolución en el solvente elegido [180].

#### 3.7.2 Parámetros asociados al procesamiento

Los parámetros de procesamiento que pueden influir al producir fibras incluyen:

- Conducción de fuerza de campo eléctrico
- Distancia /movimiento del colector en relación con la aguja
- Cualquier campo magnético o eléctrico adicional
- Presión hidrostática en la solución y en el caudal
- Elección de aguja

##### 3.7.2.1 Fuerza del campo eléctrico

El voltaje eléctrico requerido para producir un chorro a partir de una solución de polímero debe tener un potencial mayor que la energía superficial de la solución en la interfase solución/atmósfera. Una mayor intensidad de campo proporciona una aceleración más rápida del chorro emitido, cuando una masa igual de solución es expulsada. Este aumento en la velocidad del chorro debería reducir el grosor de la fibra o llevar a una solidificación incompleta, ya que el polímero llegara al colector en un tiempo más corto. Como se mencionó anteriormente, el electrohilado solo ocurrirá cuando la energía potencial eléctrica suministrada sea mayor que la energía superficial de una gotita de solución.

Cuando la energía potencial eléctrica se acerca al valor de la energía de la superficie, la forma de la gota se distorsiona para formar un cono de Taylor. Como el voltaje crítico al que ocurre esto depende de varios factores, incluida la tensión superficial de la solución, el diámetro de la gota y la intensidad del campo eléctrico (distancia al objetivo), alterar el voltaje puede compensarse con pequeños cambios en otros parámetros. Es sencillo mantener la intensidad de campo eléctrico constante cuando se utiliza un suministro de voltaje variable. Los voltajes usados durante el proceso de electrohilado suelen estar en el rango de 5–35 kV [164].

#### 3.7.2.2 Colectores

El tipo de colector que se utiliza en el proceso afecta la morfología de las fibras recogidas. Una placa colectora simple formará una estera de fibras no tejidas en una orientación aleatoria, mientras que otros colectores diseñados específicamente pueden recoger fibras alineadas. Los colectores especializados incluyen discos giratorios, tambores, entre otras formas de discos, para los cuales la velocidad de rotación es un factor importante que afecta la tasa de deposición de fibra [171].

#### 3.7.2.3 Distancia

La distancia entre la aguja y el colector es un factor clave que determina la morfología de las fibras que se producen. Como se mencionó anteriormente, el alargamiento y adelgazamiento del chorro solo ocurre mientras el chorro está en vuelo y todavía fluye. Este alargamiento se produce debido a la carga de repulsión entre iones en la solución, combinada con un tirón hacia el colector. Las inestabilidades de flujo en el chorro pueden hacer que gire, lo que aumenta la distancia de viaje. Mientras que en vuelo, la solución de polímero se solidifica a medida que el disolvente se evapora, lo que produce la formación de fibras poliméricas. Por lo tanto, si se aumenta la distancia de giro aumentará el tiempo de adelgazamiento y siempre que el polímero no solidifique, el diámetro promedio de la fibra se reducirá. Para asegurar que este alargamiento ocurra en toda la distancia, el solvente, la temperatura, la humedad y la composición de la atmósfera deben mantenerse constantes, de manera que el chorro se solidifique antes de golpear al colector. Si el chorro no es sólido cuando golpea el colector, las fibras pueden formar una red. Además, el campo eléctrico debe ser suficiente para acelerar el chorro de polímero en toda la distancia, teniendo en cuenta las fuerzas opuestas, tales como resistencia al aire y concentraciones de carga localizadas. La distancia de giro también tiene un efecto en la intensidad de campo; a medida que esta distancia aumenta, el campo se debilita siguiendo una relación cuadrada inversa [181].

#### 3.7.2.4 Caudal

La velocidad a la que se expulsa la solución de polímero de la aguja es típicamente gobernada por la presión hidrostática, usando una bomba para jeringa. La fuerza requerida para entregar la solución a una velocidad constante dependerá de varios factores, incluido el diámetro de la punta de la jeringa y la viscosidad de la solución. Si el caudal es demasiado bajo, la solución puede solidificarse en la aguja, o no ser capaz de formar un cono de Taylor, debido a una deficiencia de solución en la punta de la aguja. Incluso cuando el caudal es suficiente para producir nanofibras, pueden ocurrir complicaciones debido a la velocidad de flujo, como el goteo de la solución o la formación de "orugas" en la punta de la aguja. Se produce una "oruga" cuando la solución se solidifica en la interface atmosférica formando un tubo de polímero. En la práctica, disminuir la distancia de giro induce a producir fibras de alta calidad. El caudal debe elegirse dependiendo de la elección y concentración de polímero/disolvente. El incremento en el caudal también tiene un

efecto durante el proceso de electrohilado en el diámetro de las fibras y en la producción de defectos. Esto se debe a que cuando el caudal aumenta se expulsa un mayor volumen de solución de la punta de la aguja al colector. Si hay un mayor volumen de solución en movimiento a una distancia establecida, las fibras resultantes serán más gruesas [182].

#### 3.7.2.5 Aguja

El efecto del diámetro de la punta de la aguja ha sido ampliamente revisado, se concluyó que el diámetro interno tiene un efecto en el caudal de la solución de polímero, así como en la forma y el tamaño de la interfaz aire/solución, que finalmente influye en el voltaje crítico requerido para que se lleve a cabo el proceso de electrohilado [183, 184]. El diseño de la aguja varía mucho en la literatura. En la mayoría de las aplicaciones, se usa una aguja hipodérmica simple donde con la punta se forma una abertura plana. Las jeringas que se venden comercialmente vienen con agujas de diferentes medidas.

#### 3.7.3 Parámetros ambientales

Como se mencionó anteriormente, los parámetros ambientales pueden cambiar en un día a otro y laboratorio a laboratorio. Estos parámetros ofrecen la mayor oportunidad de permitir que las fibras se produzcan de manera más consistente. Los factores ambientales que incluyen son:

- Humedad
- Temperatura
- Composición y movimiento del gas ambiental

##### 3.7.3.1 Humedad

La humedad del ambiente afectará a cada solución de forma diferente, dependiendo del solvente utilizado y la hidrofilia de la solución de polímero. Las soluciones acuosas obviamente son las soluciones más afectadas, ya que la humedad es una medida de la presión de vapor del solvente en la atmósfera y se puede esperar que el agua en solución y en la atmósfera interactuará. Se ha reportado que el aumento de la humedad durante el proceso de electrohilado de soluciones acuosas vuelve lento el proceso de solidificación, lo que provoca el aumento tanto en la formación de defectos en forma de cuentas como en los diámetros de las fibras producidas [185]. La velocidad de evaporación de un líquido puro de una superficie libre es proporcional a la diferencia entre la presión de vapor saturado (100% de humedad en el caso de una solución acuosa) y la presión de vapor del medio ambiente. Alta humedad disminuirá la velocidad de evaporación del agua, aumentando así el tiempo de secado, lo que producirá fibras más delgadas dando tiempo suficiente para que el agua se evapore por completo antes de que el chorro golpee el colector. Las soluciones no acuosas pueden verse afectadas de varias maneras. Si la presión del agua es demasiado alta, la evaporación del solvente durante el proceso se volverá lenta por un efecto de saturación, incluso si no hay solvente presente en la atmósfera. Habrá un límite de la cantidad de líquido que se puede contener en la atmósfera a una cierta presión antes de que el agua o el solvente comiencen a condensarse nuevamente en forma líquida. Este factor puede tener varias consecuencias, se pueden producir fibras más delgadas o bien pueden producirse tiempos de solidificación más largos o puede formarse una capa de fibras coaguladas debido a la solidificación incompleta. Otro impacto que la humedad tendrá en las soluciones no acuosas es que la solución puede absorber agua durante el vuelo. La tasa de la absorción dependerá de la afinidad del material por el agua y la capacidad

de la solución para absorber agua. Este fenómeno podría causar una desaceleración en la evaporación, lo que puede causar un aumento en el diámetro de la fibra, e introduce poros en la superficie de la fibra debido a las variaciones de concentración de solvente, o bien induce la formación de pelusas coaguladas en lugar de fibras no tejidas [186].

#### 3.7.3.2 Temperatura

La temperatura ambiente en la que se realiza el hilado tiene un efecto considerable sobre las fibras producidas. Hay dos efectos principales que resultan de un aumento de la temperatura: la velocidad de evaporación del disolvente aumenta y la viscosidad de la solución disminuye. La velocidad de evaporación del disolvente aumenta en relación con un aumento en la temperatura. En un ambiente más cálido, las moléculas individuales de solvente tendrán más energía y así más moléculas tendrán la energía requerida para saltar de forma líquida a gaseosa, haciendo que la solución se seque más rápido. La viscosidad de la solución de polímero disminuye con un aumento de la temperatura; esto se atribuye a varias propiedades de la solución de polímero. Se produce el ablandamiento de los polímeros a temperaturas más altas, con dos pasos principales que ocurren en dos puntos: la transición vítrea (donde el polímero cambia su comportamiento de deformación de frágil a elástico) y el punto de fusión (donde las cadenas de polímero se desenredan para permitir el flujo viscoso).

Cuanto mayor es la temperatura, más flexibilidad se muestra por cada molécula de polímero individual. Las cadenas del polímero tienen un mayor grado de libertad de movimiento, debido a que al aumento de la energía rompe o debilita los enlaces entrecruzados, las fuerzas de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno entre las cadenas. Si las cadenas de polímero tienen más libertad de movimiento (es decir, menor viscosidad), la solución podrá fluir más rápido y requerirá menos energía para inducir flujo, lo que permite que el polímero se alargue más y se vuelva más delgado durante su vuelo. En general, la temperatura tiene dos efectos opuestos sobre el proceso relacionado con un cambio en la velocidad de evaporación del disolvente y en la viscosidad. A altas temperaturas, la solución se seca rápidamente, lo que deja poco tiempo para el alargamiento y el adelgazamiento de las fibras. Sin embargo, a mayor temperatura, la disminución en la viscosidad hará que la solución fluya más rápido antes del secado, esto permite que la fibra pueda alargarse más [181].

#### 3.7.3.3 Composición y movimiento del gas medio ambiental

La oxidación de membranas de electrohilado de celulosa ha sido investigada, aunque esta oxidación se logra después de electrohilar la fibra, es posible oxidar la celulosa durante la producción de las fibras mediante el control del medio ambiente. También ha resultado favorable usar una aspiradora para controlar el campo eléctrico. El polipropileno fundido fue electrohilado al vacío para producir campos eléctricos más altos de lo normal. En estos casos, es probable que el electrohilado bajo vacío o dentro de una atmósfera controlada tenga un impacto significativo en la velocidad de solidificación del polímero. La evaporación de solventes en el vacío es muy rápida, ya que el punto de ebullición de los líquidos es proporcional a la presión atmosférica [187].

Llevar a cabo el proceso de electrohilado en un entorno cerrado durante largos periodos de tiempo puede provocar la formación de inconsistencias en la fibra, ya que la acumulación de solvente en la atmósfera afecta la velocidad de evaporación del disolvente. Eliminar constantemente el disolvente saturado durante el proceso puede ayudar a mantener una concentración constante de

solvente en la atmósfera. Usar un sensor para monitorear la concentración de solvente en la atmósfera a través de la ventilación podría ser una forma útil de mantener una tasa de evaporación constante. El flujo de aire alrededor de un equipo de electrohilado también tendrá un efecto profundo en las fibras producidas. Todas las fibras producidas en un entorno sin vacío estarán sujetos a ser arrastrados cuando pasen por la atmósfera, como cualquier otro objeto. Al controlar la dirección y la velocidad de cualquier flujo de aire, la velocidad del vuelo de un chorro de polímero puede ser controlado. Por ejemplo, si la dirección neta del flujo de aire se opone a la dirección del flujo de chorro de polímero, se puede aumentar el alargamiento de la fibra, ya que el chorro de polímero se desplazará con el aire y se incrementará el tiempo necesario para contactar con el colector [181].

#### 3.7.4 Materiales

Como se mencionó anteriormente, técnicamente, casi cualquier polímero soluble con un peso molecular suficientemente alto puede ser electrohilado. El método puede ser aplicado a polímeros sintéticos y naturales, mezclas de polímeros y polímeros cargados con cromóforos, nanopartículas o agentes activos, así como para metales y cerámicas. En los primeros estudios de electrohilado, la técnica se centró principalmente en polímeros sintéticos, tales como el poli (óxido de etileno) (PEO), el nylon, la poliimida, la poliaramida y la polianilina. Sin embargo, rápidamente se observó que esta técnica también podría usarse para producir fibras ultrafinas de algunos polímeros que ocurren naturalmente como el ADN [164, 168].

#### 3.7.5. Aplicaciones

El electrohilado tiene la capacidad única de producir fibras ultrafinas de diferentes materiales en varios conjuntos fibrosos. Debido a su tamaño, las fibras electrohiladas pueden formar una malla altamente porosa y su gran relación superficie/volumen las hace ideales para muchas aplicaciones [188].

##### 3.7.5.1 Filtros y textiles

Las mallas de fibra electrohilada son excelentes materiales para ser usados como filtros y textiles debido a su alta porosidad, interconectividad, espacio intersticial a microescala y gran relación superficie/volumen. Las nanofibras electrohiladas pueden ser utilizadas como membranas de exclusión por tamaño, ya que son efectivas en la eliminación de partículas de aguas residuales. La eficiencia de filtración de una membrana de nanofibra ha sido estudiada, se encontró que el material nanofibroso fue extremadamente efectivo para la eliminación (~100% de rechazo) de partículas en el aire con diámetros entre 1  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ . Aunque las membranas fibrosas electrohiladas pueden exhibir grandes ventajas sobre materiales convencionales en aplicaciones ambientales, como filtración de aire y agua, todavía quedan muchos desafíos en sus aplicaciones, como las bajas tasas de producción en masa de ultrafibras de alta calidad y la selección de materiales y química apropiada para introducir la funcionalidad deseada, para satisfacer necesidades específicas [188].

##### 3.7.5.2 Aplicaciones médicas (administración de fármacos e ingeniería de tejidos)

En el campo del uso médico, la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos son las dos áreas principales de trabajo establecido y son el principal objetivo en la investigación de fibras de biopolímeros electrohilado. Kenawy y colaboradores exploraron esteras electrohiladas de PLA,



### 3. Marco Teórico

---

poli (etileno-co-acetato de vinilo) (PEVA) y sus mezclas, para su uso como sistemas de administración de fármacos. Encontraron que las membranas electrohiladas cargadas con drogas liberaron relativamente bien el clorhidrato de tetraciclina, que se utilizó como fármaco modelo. En total, el porcentaje de fármaco liberado de la fibra electrohilada fue mayor que el liberado cuando se utilizaron películas moldeadas, debido a su área de superficie mucho más alta [189].

Por otra parte, la ingeniería de tejidos utiliza andamios para proporcionar soporte temporal para la adhesión de células que regeneran la matriz extracelular que ha sido destruida por enfermedad, lesión o defectos congénitos. El electrohilado proporciona una estructura porosa 3D poco conectada con un área de superficie alta que puede imitar la estructura de la matriz extracelular y, por lo tanto, se convierte en un excelente candidato para uso en ingeniería de tejidos. El uso de fibras electrohiladas en aplicaciones de ingeniería de tejidos a menudo implica la optimización sobre varias consideraciones, incluida la elección del material, orientación de la fibra, porosidad, modificación de la superficie y aplicación de tejidos. Los requisitos para que un material se use en ingeniería de tejidos son biocompatibilidad y biodegradabilidad, ya que el andamio debe degradarse con el tiempo y ser reemplazado por tejidos recién regenerados.

Después de su fabricación, la superficie del andamio se puede modificar con una alta densidad de moléculas bioactivas, debido a que el área superficial del andamio es relativamente alta. La arquitectura del andamio también es muy importante y afecta la unión celular. Las células que se unen a los andamios con arquitecturas de microescala se aplanan y se extienden como si estuvieran cultivados en superficies planas, mientras que los andamios con arquitectura a nanoescala tienen una mayor área de superficie para absorber proteínas y presentar más sitios de unión a la célula. Las proteínas adsorbidas pueden cambiar aún más su conformación, favoreciendo la exposición de sitios de unión adicionales, y se espera que proporcionen una ventaja sobre las arquitecturas de microescala para aplicaciones de regeneración de tejidos. Se requiere una elección adecuada de biomateriales en términos de propiedades mecánicas y el tiempo de degradación, que depende del tipo de andamio requerido, el tipo de tejido a regenerar y su tiempo de regeneración [188].

Polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables (como PLA, PGA, PCL) y sus copolímeros en varias composiciones, así como polímeros naturales (como colágenos, gelatina, quitosanos, sedas y alginatos) son utilizados como materiales de soporte en la producción de membranas. Además también se han utilizado polímeros sintéticos como PLA o PCL mezclados con injerto de polímeros naturales como gelatina o quitosano. El objetivo de tales modificaciones es proporcionar superficies con mayor capacidad de adhesión y proliferación de células. Los andamios electrohilados se han empleado en diferentes tejidos u órganos humanos, incluida la piel, injertos vasculares, huesos, fibra neural y tendones o ligamentos debido a la flexibilidad de los materiales utilizados y a la capacidad de controlar las propiedades del andamio obtenido [188].

#### 3.7.5.3 Compositos y plantillas

Una de las aplicaciones más importantes de las fibras tradicionales es su uso como refuerzos en la obtención de compositos. Con estos refuerzos, los compositos pueden proporcionar propiedades estructurales, como un alto módulo de Young y relaciones de resistencia a peso, que generalmente no se pueden lograr con otros materiales. Esta metodología también se puede aplicar a fibras de electrohilado para aplicaciones médicas. La estructura de las nanofibras de electrohilado se puede aplicar como matriz de soporte o plantilla, y por lo tanto se pueden obtener nanocompuestos con propiedades estructurales superiores y una variedad de componentes funcionales. Por ejemplo,

nanopartículas, nanocables, en particular especies moleculares se puede agregar directamente a la solución de electrohilado para obtener nanofibras con una diversa gama de composiciones y funcionalidades bien definidas. Mientras tanto, las fibras de polímero electrohiladas pueden usarse como plantillas en la preparación de fibras huecas para producir nanofibras [188].

#### 3.7.5.4 Otros

Las fibras electrohiladas también se están explorando para su uso en muchas otras aplicaciones, como dispositivos electrónicos micro/nano, sensores y catálisis, todo lo cual podría tener aplicaciones biomédicas. Las nanofibras de polímero electrohilado también podrían usarse en el desarrollo de sensores, ya que la gran área superficial de las nanofibras facilita el aumento de la sensibilidad. Además, agentes catalíticamente activos (tanto catálisis heterogénea como homogénea) pueden dispersarse en nanofibras de polímero. La estructura altamente porosa de las fibras electrohiladas, con una porosidad total de hasta el 95%, permite un flujo de gases o fluidos a través del sistema catalizador. La dimensión a nanoescala de las nanofibras da como resultado altas áreas superficiales, lo que produce mayor contacto entre los componentes de la mezcla de reacción y las fibras [188].

#### 3.8 Recuperación del fósforo contenido en biomasa de microalgas

El uso de fertilizantes químicos ha contribuido a la alimentación de miles de millones de personas ya que aumenta los rendimientos agrícolas. Sin embargo, el mineral de fósforo, que es la principal fuente mundial de fertilizantes, es un recurso no renovable que se está volviendo cada vez más escaso y costoso. Si no se realizan cambios en la demanda actual del fósforo para alimentar a una población mundial cada vez mayor, la demanda a largo plazo aumentará ya que es necesario satisfacer las dietas hacia más carne y productos lácteos [190].

El fósforo (P) es un elemento esencial en el ADN, los lípidos de ARN, proteínas, enzimas y ATP portador de energía. Por lo general, en el entorno natural, el P se encuentra en su forma completamente oxidada, ortofosfato  $\text{PO}_4^{3-}$ , los niveles de P en el agua dulce son bajos, de alrededor de 10-25  $\mu\text{g/L}$ , debido a que se une a Al, Fe, Mn y Ca mediante la formación de sales poco solubles. Otras formas de fosfato disueltas incluyen polifosfato inorgánico y compuestos orgánicos de P, principalmente en complejos con ácidos orgánicos [191].

El P tiene un ciclo geológico inorgánico y dos ciclos orgánicos que ocurren en tierra y en el agua. El ciclo geológico dura varios millones de años. Inicia en la transferencia de P de los suelos erosionados al fondo del mar. Posteriormente el P que se encuentra en los sedimentos del mar, se levanta lentamente para regresar a la tierra, gracias al levantamiento tectónico. El ciclo orgánico parte de la absorción del P por las plantas, las plantas son utilizadas por los seres humanos y animales que luego producen residuos orgánicos. El P en los residuos orgánicos puede ser utilizado en la agricultura o se une al ciclo geológico, ya que se adhiere al suelo, Figura 10 [192].

Las mayores reservas de mineral de P se encuentran en Marruecos, Irak, China, Argelia y Siria. Además, se han detectado grandes depósitos en las plataformas continentales en los océanos Atlántico y Pacífico. Sin embargo, la recuperación de estos depósitos es cara, por lo que solo se consideraran una alternativa cuando se desarrolle tecnología de extracción rentable [193]. Las estimaciones de la suficiencia de recursos de P varían entre 60 y 240 años, la más común es de 100 años [194].

### 3. Marco Teórico

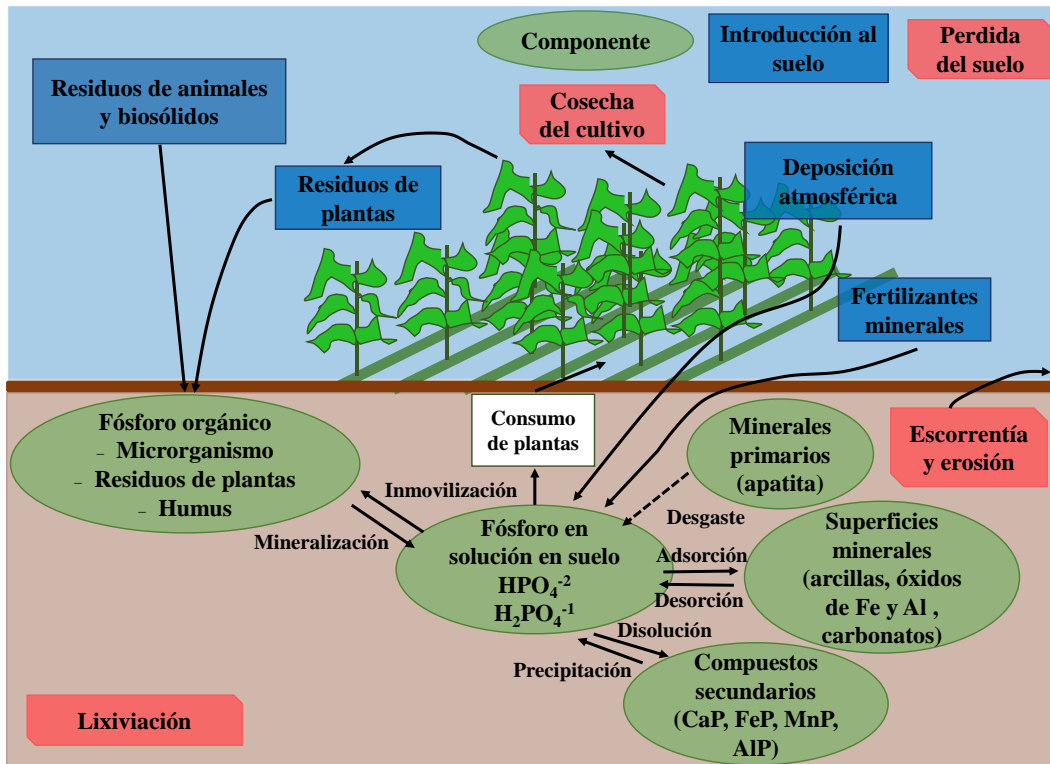


Figura 10. Ciclo del fósforo.

Otra forma de expresar los recursos es el pico de P, que indica en cuanto tiempo se agotarán los recursos de mineral de P de alta calidad y fácil acceso. El pico de P estima que esto puede ocurrir en este siglo, posiblemente antes del año 2040, después de lo cual la demanda superará a la oferta, por lo que la producción comenzará a disminuir y el consumo será rebasado por el suministro. Sin embargo, hay consenso en que los minerales de roca fosfórica están en declive, el acceso físico a los minerales será cada vez más difícil y es probable que aumenten los costos de energía y la generación de residuos, Figura 11 [194, 195].

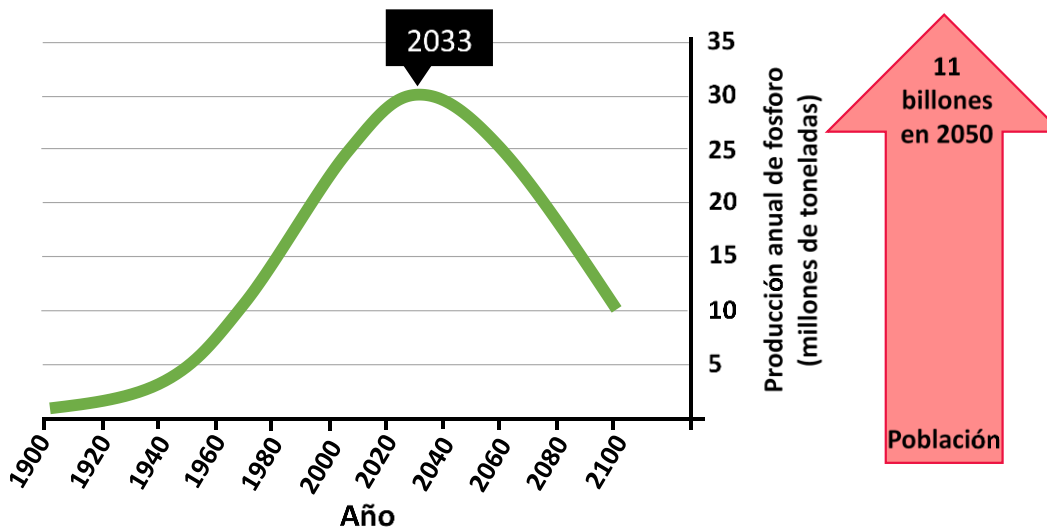


Figura 11. Tiempo estimado para el pico de fósforo.

Por otra parte muchos de los suelos agrícolas del mundo con baja disponibilidad de P (es decir, donde el P está estrechamente unido o fijado a otros compuestos) se encuentran en los países en desarrollo, regiones donde los agricultores tienen bajo poder adquisitivo para acceder a los mercados de fertilizantes. Aunque todavía hay mucho debate sobre la longevidad de las reservas de fosfato, científicos y la industria coinciden en que existe una fuerte necesidad de aumentar el reciclaje y el uso eficiente de P en todo el sistema alimentario [194, 195].

#### 3.8.1 Usos del fósforo

##### 3.8.1.1 Fertilizantes

De acuerdo con el Servicio Geológico de Estados Unidos (2010), alrededor de 80 a 90% del mineral de P extraído se utiliza en la industria de fertilizantes. Por ejemplo, alrededor del 95% del mineral de P procesado en los Estados Unidos se extrae como ácido fosfórico o ácido hipofosforoso; estos productos químicos son necesarios en la producción de fertilizantes como MAP (fosfato monoamónico) o DAP (fosfato diamónico) y en suplementos de forraje para animales.

El P junto con el nitrógeno y el potasio son los tres nutrientes primarios en los fertilizantes. Adicionalmente pueden contener nutrientes secundarios (Ca, Mg, S), y micronutrientes tales como Mn, B, Zn, y Fe. Los fertilizantes deben tener una estructura adecuada para una fácil aplicación en los campos, que los nutrientes se encuentren en forma disponible para las plantas y bajas concentraciones de sustancias nocivas [196].

##### 3.8.1.2 Detergentes

Los fosfatos se utilizan en limpiadores domésticos para ablandar el agua, con el fin de mejorar el proceso de lavado, para la eliminación y prevención de incrustaciones en las fibras y como portadores de otros ingredientes del detergente. Anualmente, los 25 países que conforman la unión europea, con una población total de 456 millones de personas, consume alrededor de 110, 000 toneladas de P como detergente. En comparación, el uso de fosfatos en fertilizantes equivale a aproximadamente 1.25 millones de t/ de P. El tipo de fosfato más comúnmente utilizado en los detergentes es el tripolifosfato de sodio (STPP). La preocupación por la eutrofización se ha traducido en la disminución del uso de detergentes en muchos países y la sustitución de los fosfatos con otros productos químicos. La principal alternativa al uso de STTP en detergentes para ropa es la zeolita. Sin embargo, los detergentes para lavar platos siguen siendo con base en P, principalmente [197].

##### 3.8.1.3 Otros usos del fósforo

Además de limpiadores para el hogar, otros compuestos de P son utilizados para la elaboración de productos que son utilizados en la vida diaria, tales como pasta de dientes y champús. En la industria alimentaria son parte de los bicarbonatos utilizados y están presentes en los refrescos embotellados en forma de ácido fosfórico, para la prevención del crecimiento de bacterias y amortiguar el pH. Recipientes metálicos de manganeso, hierro y zinc, especialmente aquellos que se usan en la industria alimentaria son fosfatados para proporcionar un revestimiento inerte e insoluble y evitar la liberación de metal a los alimentos y, por lo tanto, intoxicaciones metálicas [198].

---

### 3. Marco Teórico

---

Los compuestos de P (por ejemplo, tricloruro de fosforilo  $\text{POCl}_3$ ) se utilizan en textiles y otros materiales inflamables, tales como polímeros sintéticos, pinturas y revestimientos protectores de madera. Estos materiales se tratan con compuestos de P para reducir el riesgo de incendio. En los dispositivos eléctricos, el oxiclorigenato de P se utiliza simultáneamente como plastificante y retardante de llama, para disminuir los riesgos causados por la electricidad y calor en las máquinas.

Lubricantes de alta temperatura contienen pentasulfuro de P para llegar a una buena lubricación, estabilidad térmica y resistencia al fuego [198]. En el tratamiento de agua potable, el P se utiliza para el control de la corrosión y la inhibición de incrustaciones [199].

#### 3.8.2 Fósforo en la industria alimentaria

El P en el sistema mundial de alimentos por lo general comienza en el sector minero. Cuando el mineral de P es extraído, se limpia y se transfiere a la industria de fertilizantes, donde es procesado químicamente. Estos fertilizantes se comercializan a nivel mundial y luego entran al sector agrícola, donde se aplican con regularidad a los campos y pastos, una parte del P aplicado es absorbido por las plantas raíces y ganado, posteriormente deja los campos en forma de cosechas. Otra parte del P se queda en el suelo erosionado o permanece en los residuos de cultivos, suelos y abonos. El sector de alimentos procesa el P que se encuentra en los cultivos, productos animales, vegetales (cereales, cultivos hortícolas) y alimentos de origen animal, tales como carne, leche, huevos y pescado. Algunos de estos productos son consumidos por la población humana; el resto acaba en los residuos orgánicos con destino a vertederos o composta. Casi todo el P presente en los alimentos es consumido por los seres humanos donde finalmente abandona el cuerpo en la orina y las heces; esto ingresa a las aguas residuales (excepto en el caso de la defecación al aire libre o la reutilización) donde se somete a alguna forma de tratamiento y en gran parte termina en los océanos, los ríos o en tierra [190].

En última instancia, sólo una quinta parte del P extraído para la producción alimentaria se encuentra en la comida consumida por la población mundial cada año [190]. La producción de alimentos y el sistema de consumo actual es extremadamente ineficiente con respecto al uso de P. Algunas de estas pérdidas son permanentes, como el P en el estiércol, mientras que otras pérdidas son temporales, como el fertilizante residual que queda en el suelo disponible para las plantas [200]. El P se pierde en todas las etapas de producción de alimentos, incluso en la minería, la producción de fertilizantes, la producción de cultivos, la producción ganadera, el procesamiento, distribución y consumo de alimentos. Algunas de estas pérdidas (por ejemplo, las fracciones de los cultivos no comestibles, tales como cáscaras de plátano o de hojas de maíz) son inevitables aunque en algunos casos los residuos pueden ser reciclados para extraer el P presente [190].

#### 3.8.3 Fósforo en aguas residuales

El P contenido en aguas residuales se deriva de fuentes industriales y domésticas. Las principales fuentes domésticas de P son los residuos metabólicos humanos, detergentes y productos de limpieza. Los seres humanos producimos entre 1-1.5 g P/persona/día en los excrementos que son desechados a las aguas residuales, mientras que la carga de detergentes es de 0.3 kg/por habitante/día [201, 202]. Esto significa que a nivel mundial, la población humana produce alrededor de 3 millones de toneladas de P solo en sus excrementos. Aproximadamente el 10% se devuelve actualmente a la agricultura como lodos o directamente como aguas residuales. Esto significa, que en promedio, aproximadamente el 90% termina en ríos, lagos, océanos del mundo o

tierras no agrícolas cada año. La concentración media de P en las aguas residuales es de 4 a 16 mg/L, aproximadamente el 50% está en forma de ortofosfato inorgánico soluble, 35% son complejos de fosfatos inorgánicos (polifosfatos) tales como los fosfatos de los detergentes y el 15% son fosfatos orgánicos encontrados en materia orgánica y el protoplasma celular de microorganismos presentes en el agua [190, 203].

El aumento de la recuperación de P en aguas residuales no sólo puede generar fertilizantes renovables, sino también reducir la carga de nutrientes que se consideran contaminantes y, por lo tanto, la reducción del proceso de eutrofización, por otra parte, también ayudará a mejorar el proceso de tratamiento de aguas residuales y aumentar la seguridad de los fertilizantes mediante la reutilización en la agricultura local [204, 205]. Problemas de las últimas décadas con la eutrofización en aguas superficiales han resultado en estrictos valores límites del contenido de P para los efluentes de tratamiento de aguas residuales [206].

#### 3.8.4 Recuperación de fósforo de aguas residuales

Una posible fuente para el reciclaje de P son las aguas residuales municipales. Dentro del proceso de tratamiento de aguas residuales, el P ligado a partículas sólidas comprende alrededor del 11% de la carga total y se retira en el tratamiento primario. Durante el tratamiento primario, las aguas residuales pasan a tanques de sedimentación, cuyo objetivo es eliminar los sólidos sedimentables por gravedad [194]. El tratamiento secundario tiene como objetivo reducir la DBO mediante la reducción de la materia orgánica; esto es mediado principalmente por una población mixta de bacterias heterótrofas que utilizan los constituyentes orgánicos del agua residual para obtener energía y generar crecimiento. Para poder llevar a cabo el tratamiento secundario, es necesario un alto contenido de P en el agua residual ya que funciona como sustrato para los microorganismos. El lodo activado, por ejemplo, requiere una de una relación de  $DBO_5/P$  de 1:100 que es igual a las exigencias de cualquier otro proceso biológico [207]. Por Consiguiente el tratamiento biológico puede quitar del 20 al 30% de P, incluso sin un proceso de eliminación de P específico, quedando restante el P que no está unido al proceso de lodos activados y debe de ser eliminado durante el tratamiento terciario [201,203].

El proceso de tratamiento terciario tiene como objetivo eliminar todos los iones orgánicos, esto se puede lograr biológica o químicamente. El proceso biológico ha mostrado tener un buen desempeño en comparación a los procesos químicos que son, en general, demasiado costosos y pueden conducir a generar contaminación secundaria. Además, cada etapa de tratamiento adicional en un sistema de aguas residuales aumenta en gran medida el costo total [43]. Un completo tratamiento terciario ayuda a la eliminación de nitrato y fosfato de amonio. Los tratamientos avanzados se basan generalmente en técnicas complejas, tales como la precipitación química, la ozonación, la ósmosis inversa o la adsorción en carbón activado. Estas técnicas incluyen procesos diseñados para eliminar determinados nutrientes, tales como fósforo o nitrógeno que pueden estimular la eutrofización en determinadas situaciones [208].

#### 3.8.5 Fósforo en microalgas

Durante la extracción de lípidos de la biomasa microalgal para generar combustibles líquidos la mayoría del N y P no son utilizados, por lo que es posible reciclar los nutrientes presentes en la microalga: en particular el reciclaje de P. Unos de los objetivos de esta investigación es estudiar

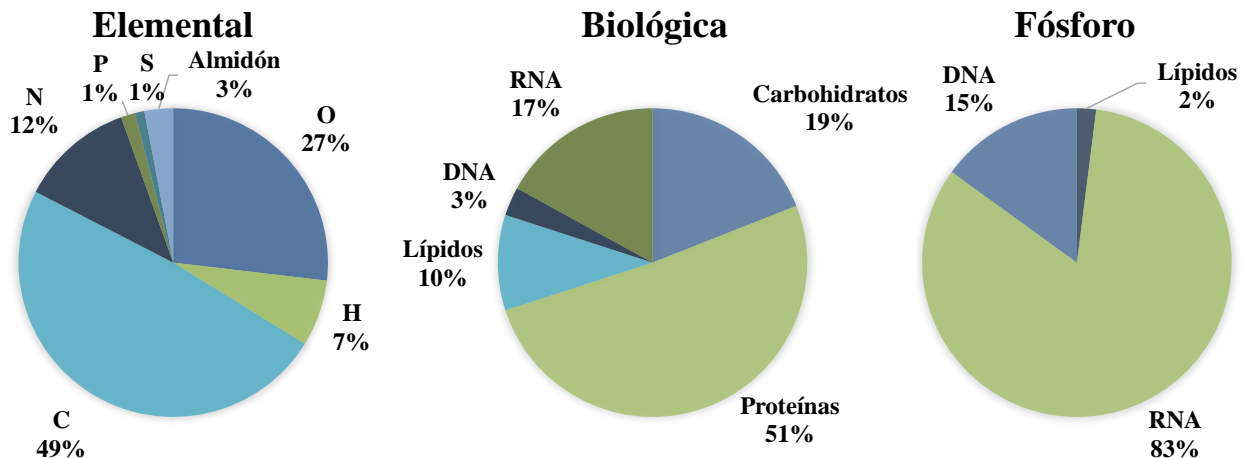
### 3. Marco Teórico

la recuperación de P, por lo que es necesario conocer donde se encuentra el P dentro de las células microalgales, para enfocar los esfuerzos de recuperación correctamente.

Investigaciones recientes se han centrado en estudiar las fracciones bioquímicas en las células de microalgas marinas, llegando a la conclusión de que estas fracciones pueden variar en función de las condiciones de crecimiento. Sin embargo, esto proporciona pistas para entender el destino de P después del procesamiento de lípidos, proteínas y carbohidratos [209, 210].

Los estudios realizados indican que el P puede estar situado dentro del adenosín trifosfato (ATP), lípidos y ácidos nucleicos. El ATP contiene más del 18% en peso de P ( $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ ), pero comprenden menos de 30  $\mu\text{g}$  por g de masa celular; por lo tanto, el P asociado con ATP es de 5  $\mu\text{g}$  por g de célula. Las formas difosfato ADP y monofosfato AMP son fracciones más pequeñas de la masa celular con menos P incorporado y también son contribuyentes insignificantes de almacenamiento de P celular [211].

El contenido de P en los fosfolípidos es función de la fracción de los lípidos presentes en las microalgas y altamente dependiente de las condiciones de cultivo. En algunos estudios se encontró que del contenido total de fosfolípidos en algunas microalgas es de aproximadamente 3.8% en peso es P. Por esta razón, no se espera que un alto contenido de P en los lípidos. Por otro lado, también se estimó el contenido de P asociado con el ADN y ARN, en comparación con la composición biológica de la célula que es de 3% ADN y ARN 17% en peso con su composición elemental donde el 10 % de ADN y ARN es P [212, 213]. Por lo tanto, el P asociado con ADN comprende aproximadamente el 0.3% del total del peso de la célula y el P asociado con ARN es 1.7% del peso total de las células; esto es, respectivamente 15% y 83% del P total celular. En consecuencia, se espera que la mayoría del P celular se encuentre en los ácidos nucleicos. Esto también se observó en estudios realizados con cianobacterias, donde la mayoría del P total celular se encuentra asociado con el ARN, por lo que se concluye que el ARN es la fracción de la microalga más abundante en P, seguido de fosfolípido y ADN, Figura 12 [209, 214].



**Figura 12.** Ubicación estimada de P en *Synechocystis sp.* PCC 6803: a la izquierda composición elemental; al centro composición biológica y a la derecha contenido de fósforo en ADN, ARN y lípidos. Todos los números dados son en por ciento en peso de la biomasa total o P total en la biomasa [212, 215, 216].

#### 3.8.6 Métodos de recuperación de fósforo

Para recuperar el P de la biomasa microalgal, primero se debe oxidar el P ligado a los compuestos orgánicos a ortofosfato inorgánico (orto- $\text{PO}_4^{-3}$ ). Esto es necesario para mejorar la eficiencia del siguiente paso, que es la captura del orto- $\text{PO}_4^{-3}$ , ya que es más reactivo y se puede capturar selectivamente, para generar un producto reutilizable.

En la actualidad existen muchos métodos de recuperación de P. Dentro de los más utilizados para liberar P orgánico de la biomasa residual se encuentran los procesos de oxidación avanzada con peróxido de hidrógeno y calentamiento por microondas o bien el uso de ozono. La oxidación avanzada crea radicales hidroxilos libres, que son altamente eficientes para atacar la materia orgánica y liberar el P como orto- $\text{PO}_4^{-3}$ . Esta transformación puede implicar reacciones de oxidación e hidrólisis [217, 218]. Si bien es posible encontrar tecnologías que requieran menor cantidad de energía, tales como las celdas microbianas de combustibles e hidrólisis enzimática, o que no diluyen la biomasa tal como el dióxido de carbono supercrítico, los procesos de oxidación avanzada demuestran el principio para la liberación de orto- $\text{PO}_4^{-3}$  [219, 220].

Por otro lado, dentro de las técnicas más utilizadas para recuperar el orto- $\text{PO}_4^{-3}$  se encuentran la adsorción, el intercambio iónico o la precipitación como estruvita, la técnica más utilizada es la precipitación de estruvita ya que producen un sólido de baja solubilidad que pueden ser de gran utilidad en la agricultura: muestra cualidades comparables con fertilizantes comerciales, además puede ser utilizado en industrias de detergentes, cosméticos, comida para animales y cemento [221].



# **METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

## 4. Metodología Experimental

### 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

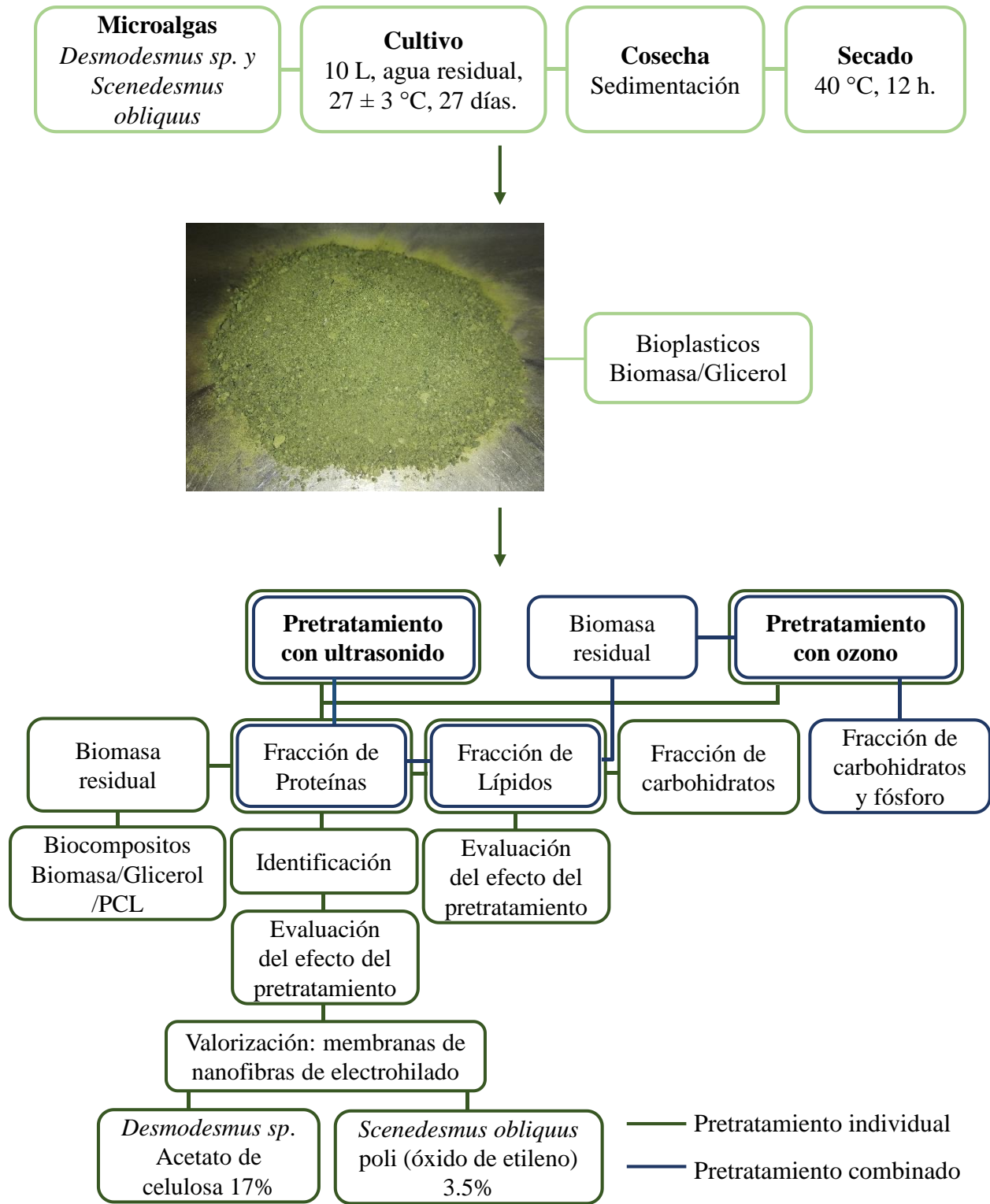


Figura 13. Diagrama de flujo de la metodología experimental.

## 4. Metodología Experimental

### 4.1 Muestras de microalga

La microalga *Desmodesmus sp.* es una microalga nativa y fue aislada del lago artificial “Nabor Carrillo”, localizado en Texcoco, México, adaptada al agua residual por el grupo de trabajo “Nuevas tecnologías para la obtención de biocombustibles a partir de microalgas cultivadas en agua residual”, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Orta Ledesma. La microalga, *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing, fue proporcionada por el Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

### 4.2 Cultivo de microalgas

La biomasa de *Desmodesmus sp.* y *Scenedesmus obliquus* se cultivó en reactores de 10 L a temperatura ambiente ( $20 \pm 3$  °C) utilizando agua residual municipal como medio de cultivo ( $33.7 \pm 2.2$  mg/L  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $20.3 \pm 0.6$  mg/L orto- $\text{PO}_4^{3-}$  y  $467.5 \pm 41.5$  mg/L DQO). La luz fue proporcionada por lámparas fluorescentes bajo períodos de luz/oscuridad de 12:12 h. Después de 27 días de cultivo, la biomasa se cosechó por sedimentación; luego se secó en horno a 40 °C, durante 12 h y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

La composición aproximada se determinó mediante recuentos celulares usando una cámara de recuento Neubauer y en microscopio (AX10 Lab A1, Zeiss, Jena, Deutschland). La biomasa de *Desmodesmus sp.* mostró una composición de 90% *Desmodesmus sp.*, 5% Cianobacteria sp., 5% *Mychonastes sp.* 5% *Chlorococcum sp.* Mientras que la biomasa de *Scenedesmus obliquus* mostró una composición de 85% *Scenedesmus obliquus*, 10% *Mychonastes sp.* y 5% Cianobacteria sp. Debido a que la biomasa de ambos géneros de microalgas fue cultivada en agua residual no fue posible obtener sepas puras, por lo tanto las muestra de biomasa rica en *Desmodesmus sp.* será nombrada a lo largo de esta tesis como **consorcio D**. Mientras que la muestra de biomasa rica en *Scenedesmus obliquus* será nombrada como **consorcio S**.

El contenido de lípidos, proteínas, carbohidratos y fósforo por gramo para cada consorcio se determinó mediante los métodos informados por Valeriano-González y colaboradores [222], Safi y colaboradores [223], Mirsiaghi y colaboradores [224] y USEPA PhosVer® 3, respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.-** Composición bioquímica de la biomasa de los consorcios D y S.

Biomasa	Biocomponente	Contenido (mg/g biomasa)
Consorcio D	Lípidos	$101.86 \pm 4.22$
	Proteínas	$660.35 \pm 56$
	Carbohidratos	$116.6 \pm 6.4$
	Fósforo	
Consorcio S	Lípidos	$118 \pm 16.55$
	Proteínas	$680 \pm 11.66$
	Carbohidratos	$125 \pm 9.95$
	Fósforo	

## 4. Metodología Experimental

Durante la fase de cultivo se monitoreo el pH, el contenido de sólidos suspendidos totales, nitrógeno amoniacal, nitratos, fósforo total (TP) y ortofosfatos (orto- $\text{PO}_4^{3-}$ ). En la Tabla 6 se observan los métodos utilizados.

**Tabla 6.-** Metodología usada para la caracterización fisicoquímica de los cultivos de microalgas.

<b>Prueba analítica</b>	<b>Método</b>	<b>Referencia</b>
<b>Sólidos suspendidos totales (SST)</b>	Sólidos totales en suspensión secados a 103-105 °C.	APHA-AWWA-WPCF 2540 D
<b>Nitrógeno amoniacal</b>	Método titulométrico en presencia de ácido bórico	APHA-AWWA-WPCF 4500-NH <sub>3</sub> E
<b>Nitratos</b>	Método de reducción de cadmio	HACH® Método 8171
<b>Fósforo total (TP)</b>	USEPA PhosVer® 3 Método de digestión ácida de persulfato	HACH® Método 8190
<b>Ortofosfatos (orto-<math>\text{PO}_4^{3-}</math>)</b>	Método de aminoácido	HACH® Método 8178

### 4.3 Pretratamiento de biomasa de microalgas y extracción en tándem de biocomponentes

#### 4.3.1 Diseño de experimentos

El diseño de experimentos comprendió una metodología de superficie de respuesta basada en un diseño factorial multinivel. El desarrollo del diseño y el posterior análisis estadístico se realizaron utilizando software estadístico (Statgraphics Centurion XVI, Statgraphics Technologies, The Plains, VA). Este enfoque se usó para evaluar y modelar simultáneamente los efectos de los parámetros operativos del pretratamientos con ultrasonido u ozono, en la disrupción de las células de microalgas y la eficiencia de recuperación de biocomponentes. El objetivo del estudio fue evaluar la influencia del pretratamiento con ultrasonido u ozono en la disrupción celular, la eficiencia de recuperación de biocomponentes y la intensificación de los procesos de recuperación de biocomponentes.

Para el pretratamiento con ultrasonido se consideraron tres parámetros diferentes: energía aplicada en tres niveles (50, 125 y 200 kWh/kg de biomasa), concentración de biomasa en tres niveles obtenidos por sedimentación (25, 50 y 75 g/L) e intensidad ultrasónica a dos niveles (0.32 y 0.53 W/mL) resultando en 18 experimentos. Para estudiar el efecto de la intensidad ultrasónica, se utilizaron dos baños de ultrasonidos con diferente potencia de salida (100 y 300 W). Teniendo en cuenta que ambos baños de ultrasonido funcionan a una frecuencia de ultrasonido similar (~ 40 Hz), el tiempo de operación debe ajustarse para aplicar la energía deseada. Por lo tanto, el tiempo de operación disminuye cuando la potencia de salida del baño de ultrasonido aumenta de 100 a 300 W. Con el propósito de estudiar los efectos producidos, estas dos condiciones experimentales también se describieron como baja potencia/tiempo largo y alta potencia/tiempo corto. Para el pretratamiento con ozono, se consideraron tres parámetros diferentes a tres niveles diferentes: concentración de ozono (3, 6 y 9 mg O<sub>3</sub>/L), concentración de biomasa obtenida por sedimentación (25, 50 y 75 g/L) y tiempo de contacto (5, 10 y 15 min) con 27 tratamientos.

Los rendimientos de lípidos, proteínas y carbohidratos liberados en la fase acuosa durante el proceso de pretratamiento se usaron como un indicador indirecto de la disrupción celular. La eficiencia de recuperación de biocomponentes se expresó en función de la suma del rendimiento de los biocomponentes liberados (obtenido durante el proceso de pretratamiento) y el rendimiento de los biocomponentes extraídos. El rendimiento de los biocomponentes extraídos se obtuvo de la extracción posterior de los biocomponentes en las células pretratadas. La intensificación de los procesos de recuperación de biocomponentes fue una función de la calidad de los lípidos recuperados, definida como el aumento en el porcentaje del total de lípidos recuperados que pueden convertirse en FAME, la reducción del tiempo de extracción y el gasto de solventes. Para evaluar la intensificación del proceso, se modificaron los procesos de extracción convencionales de biocomponentes. Para la extracción de lípidos, la relación biomasa-disolvente se redujo de 1:45 a 1:15 (p/v) y el tiempo de extracción de 12 h a 30 min. Para la extracción de proteínas, la relación biomasa-suspensión se redujo de 1:50 a 1:20 (p/v) y el tiempo de extracción de 1 h a 15 min. Para la hidrólisis de carbohidratos, la relación biomasa-suspensión se redujo de 1:100 a 1:20 (p/v) y el tiempo de extracción de 5 a 1 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El análisis de varianza (ANOVA) también se realizó para identificar los parámetros operativos significativos. Los efectos se consideraron significativos a un 95% del nivel ( $p < 0.05$ ).

### 4.3.2 Pretratamiento con ultrasonido u ozono

El pretratamiento con ultrasonido se realizó usando dos tipos de baños de ultrasonido: 1) un baño de 100 W, 42 kHz con una capacidad de tanque de 2.81 L (2510-MT, Branson, Hampton, NH, EE. UU.) y 2) un baño de 300 W, 40 kHz con una capacidad de depósito de 5.5 L (KS-8893, Branson, Hampton, NH, EE. UU.). Todos los experimentos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL, que contenían 25 mL de una suspensión de microalgas, se sumergieron en el baño de ultrasonido a una temperatura controlada de  $3 \pm 1.5$  °C usando hielo. La potencia acústica disipada aplicada a la solución durante este estudio se calculó determinando el aumento de temperatura en la suspensión durante los primeros 30 s del experimento. Con base en esto, utilizando el pretratamiento con ultrasonido con el baño de 42 kHz y una potencia de salida de 100 W, la intensidad ultrasónica fue de 0.32 W/mL mientras que con el baño de 40 kHz y la potencia de salida de 300 W, la intensidad ultrasónica fue de 0.53 W/mL. Estas dos condiciones se describirán como pretratamiento de ultrasonido a baja potencia/larga duración y alta potencia/corta duración.

El pretratamiento con ozono se realizó usando matraces Erlenmeyer de 250 mL, que contenían 25 mL de suspensión de microalgas. El gas ozono se proporcionó con un generador de ozono a un caudal de 0.5 L/min (Labo76, Emery Trailigaz, Wayne, NJ, EE. UU.), con una capacidad de producción de 19 g O<sub>3</sub>/h. La concentración de ozono en la fase gaseosa se determinó mediante el método yodométrico reportado por Birdsall y colaboradores [225].

### 4.3.3 Cuantificación de biocomponentes liberados en la fase acuosa

Los lípidos, proteínas y carbohidratos liberados a la fase acuosa se cuantificaron por separado después de cada pretratamiento. Los lípidos se determinaron mediante el ensayo de sulfofosfo-vainillina [226], las proteínas mediante el método de Biuret [227] y los carbohidratos mediante el método de ácido fenol-sulfúrico [228]. La cuantificación de cada biocompuesto se realizó al menos por triplicado.

### 4.3.4 Extracción de los biocomponentes microalgales residuales

Los biocomponentes microalgales residuales se extrajeron del sedimento celular pretratado en el siguiente orden: lípidos, proteínas y, finalmente, carbohidratos. Para este propósito, las suspensiones de microalgas se centrifugaron a 2500 x g, 20 °C durante 15 min.

#### 4.3.4.1 Extracción y cuantificación de lípidos

La extracción de lípidos se llevó a cabo mediante el método reportado por Valeriano-González y colaboradores [222] con algunas modificaciones, donde se reduce la relación pellet-solvente y el tiempo de extracción. Una solución homogénea de cloroformo-metanol (2:1 v/v) y el sedimento celular se mezclaron a 150 rpm durante 30 minutos, con una relación 1:15 (p/v). La mezcla resultante se centrifugó a 1500 x g, 20 °C durante 15 min. El sobrenadante se filtró a través de un papel de filtro de microfibras de vidrio Whatman, y el sedimento se conservó para la extracción de proteínas. Los filtrados utilizados se recogieron en matraces Erlenmeyer de 25 ml previamente pesados y se dejaron secar en la incubadora a 40 °C y 50 rpm. La cantidad de lípidos microalgales extraídos se calculó restando el peso del matraz Erlenmeyer del peso final constante. La extracción de lípidos se realizó al menos por triplicado.

#### 4.3.4.2 Extracción y cuantificación de proteínas

Después de la extracción de lípidos, la biomasa de algas desgrasada se secó en la incubadora a 40 °C durante 1 h, para eliminar el residuo de solventes. La extracción de proteínas se realizó mediante el procedimiento informado por Safi y colaboradores [223] con algunas modificaciones en la relación pellet-solución y tiempo de extracción. La solución madre para la extracción de proteínas se preparó de la siguiente manera: 500 mL de agua destilada se ajustaron a pH 11 con NaOH 2N, para una máxima solubilidad de proteínas. La biomasa seca se suspendió en la solución madre usando una relación 1:10 (p/v) y se agitó durante 15 minutos a 40 °C. La separación del sobrenadante del sedimento se realizó por centrifugación a 1500 x g, 20 °C durante 15 min. El sobrenadante se usó para la cuantificación de proteínas, y la biomasa residual se conservó para la hidrólisis de carbohidratos. La extracción y cuantificación de proteínas se realizó al menos por triplicado.

#### 4.3.4.3 Hidrólisis y cuantificación de carbohidratos

La extracción de carbohidratos se realizó por hidrólisis, de acuerdo con el procedimiento informado por Mirsiaghi y colaboradores [224] donde se redujo la relación pellet-solución y el tiempo de extracción. El sedimento celular se suspendió en agua destilada con una concentración de biomasa de 50 g/L, luego la suspensión se mezcló con 10% (v/v) de ácido sulfúrico concentrado (98%). La hidrólisis se realizó a 100 °C durante 1 h. La suspensión se centrifugó a 1500 x g, a 20 °C, durante 15 min. El sobrenadante se conservó para la cuantificación de carbohidratos utilizando el método de ácido fenol-sulfúrico [228]. La hidrólisis y cuantificación de carbohidratos se realizó al menos por triplicado.

### 4.3.5 Análisis de la composición de los lípidos recuperados

El fraccionamiento y análisis de la cantidad total de lípidos recuperados se llevó a cabo mediante extracción en fase sólida. Los lípidos brutos (10 mg) se disolvieron en 100 µL de cloroformo y se cargaron en un cartucho Agilent Bond Elut NH2 (100 mg), que previamente se acondicionó con 4

ml de hexano. Todos los lípidos neutros, excepto los lípidos polares y los fosfolípidos, se eluyeron en 4 ml de elución A (cloroformo: 2-propanol; 2:1 v/v). Los lípidos polares se eluyeron con 4 ml de elución B (ácido acético al 2% en éter dietílico, v/v) y los fosfolípidos se eluyeron finalmente con 4 ml de elución C (metanol). Los resultados del fraccionamiento de lípidos SPE se confirmaron por cromatografía en capa fina (TLC). El disolvente para el proceso de TLC fue hexano/éter dietílico/ácido acético (80:20:1 v/v/v). Las manchas se visualizaron rociando con una solución al 10% de ácido sulfúrico en etanol y carbonizando en una estufa durante 10 minutos a 105 °C [229]. El análisis de la composición de los lípidos recuperados se realizó al menos por triplicado.

### 4.4 Efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono en la fracción proteica de la biomasa de microalgas

#### 4.4.1 Extracción de proteínas con fenol para SDS-PAGE de la biomasa pretratada

La extracción con fenol se realizó mediante el procedimiento reportado por Faurobert y colaboradores [230] con algunas modificaciones. Un gramo de biomasa de microalgas pretratada con ultrasonido u ozono y liofilizado se suspendió en 5 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 100  $\mu$ M pH 8.8, EDTA 10  $\mu$ M, sacarosa de 900  $\mu$ g y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.4%) en un tubo Falcon de 45 ml. Luego, se añadieron 6 ml de fenol tamponado con Tris (pH 8.8) y la solución se homogeneizó dos veces con un polytron durante 1 minuto a 4 °C. Para separar el material insoluble de las fases acuosa y orgánica, la muestra se centrifugó durante 30 minutos, 4000 x g a 4 °C. La fase fenólica, que estaba en la parte superior del tubo, se recuperó cuidadosamente para evitar el contacto con la interfase y se vertió en un tubo nuevo que contenía 25 ml de solución de precipitación enfriada (acetato de amonio 100 mM en metanol). El tubo se agitó por inversión y la muestra se incubó durante la noche a -20 °C. Finalmente, las proteínas se separaron por centrifugación durante 30 minutos, 4000 x g a 4 °C. Después de la centrifugación, el sedimento se lavó dos veces con solución de precipitación enfriada, dos veces con acetona enfriada y finalmente una vez con etanol enfriado. Después de cada etapa de lavado, la muestra se sometió a mezclado con vortex durante 30 segundos y se centrifugó durante 10 minutos a 4000 x g a 4 °C. El sedimento final de proteína se suspendió en tampón IEF. En nuestras condiciones, con una suspensión inicial de microalgas de 1 g, se necesitaba 1 ml de tampón IEF [230].

#### 4.4.2 Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE)

El perfil de SDS-PAGE de los aislados de proteínas del consorcio D y del consorcio S se determinaron mediante el método de Laemmli [231] con un aparato de electroforesis universal Power Pac (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Se usó poliacrilamida al 12% como gel de resolución y acrilamida al 5% como gel de apilamiento. Se mezclaron 10  $\mu$ l de muestra suspendida en tampón IEF con 100  $\mu$ l de tampón de muestra (Tris-HCl 0,0625 M, 10% de glicerina, SDS al 2% y 2- $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0,0025%). Los pocillos se cargaron con 20  $\mu$ l de muestra junto con un marcador con un peso molecular que oscila entre 10 y 250 kD (Dual-color, Bio-Rad) y se ejecutaron a 70 V durante 2.5 h a temperatura ambiente, en un tampón SDS-PAGE en funcionamiento. Los geles se removieron y se tiñeron durante aproximadamente 16 h usando una solución de tinción Coomassie Brilliant Blue R-250 (tinción Bio-Safe™ Coomassie G-250, Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y luego se destiñeron con agua destilada. Se usó un densitómetro calibrado GS-900TM (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) para el escaneo de geles.

---

## 4. Metodología Experimental

---

Las bandas se identificaron mediante densitometría con el software de adquisición y análisis de imágenes Image Lab™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). La estimación de la concentración relativa de las bandas de proteínas se obtuvo con lisozima de clara de huevo de gallina como estándar, a una concentración de 1 µg/µL (Sigma Aldrich, MO, EE. UU.) [231].

### 4.4.3 Identificación de proteínas presentes en la biomasa de los consorcios D y S

Como se mencionó en la sección 2.4.2, las proteínas se aislaron mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida. El tratamiento de las muestras antes de la identificación se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo desarrollado en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y la Industria de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las bandas de gel se cortaron en pequeños fragmentos y se destañaron con metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 5% (v/v) por 12 h. Luego se lavaron con agua destilada y se incubaron durante 15 minutos (dos veces) en 100 mM de bicarbonato de amonio. Se redujeron en ditiotreitól (DTT) 50 mM durante 45 minutos y se alquilaron con 30 mM de yodoacetamida durante 2 h. Posteriormente, se lavaron tres veces con 100 mM bicarbonato de amonio. Las muestras de gel se deshidrataron completamente con acetonitrilo al 100% y llevaron a sequedad total. La digestión en gel se realizó con 30 µL de tripsina porcina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) modificada a partir de una solución que contiene 20 ng /µL e incubada durante 18 h a 37 °C. Los péptidos se extrajeron por sonicación en acetonitrilo al 50% (v/v) y ácido fórmico al 5% (v/v) y llevaron a sequedad total. Posteriormente, se resuspendieron en 20 µL de ácido fórmico al 1% (v/v), desalado en columnas Ziptip C18, y eluido en 12 µL de fase móvil (97% de agua, 3% de acetonitrilo, y 0.1% de ácido fórmico). El análisis de péptidos por espectrometría de masas se llevó a cabo mediante un sistema integrado de alta definición. Sistema SYNAPT G2 nano-LC-ESI-MS/MS (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) equipado con una fuente de iones NanoLockSpray y acoplado en línea a un Cromatógrafo de líquidos nanoACQUITY Ultra Performance (UPLC, Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). El sistema binario de disolventes fue 2% acetonitrilo en agua Milli-Q con ácido fórmico al 0.1% (fase móvil A) y acetonitrilo al 98% en agua Milli-Q con ácido fórmico al 0.1% (fase móvil B). La muestra se inyectó en una columna trampa CLC UPLC (5 µm, 180 µm x y 20 mm; Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) y se lavó con 100% de fase móvil A a un caudal de 15 µL/min. Los péptidos se separaron en una columna BEH, C18 UPLC (1.7 µm, 75 µm 100 mm; Waters Corporation, Milford, MA, EUA) con un gradiente lineal de hasta 40% de la fase móvil B con un caudal de 0.3 µL/min. Se realizaron búsquedas en la base de datos UNIPROT (<https://www.uniprot.org>) usando la tripsina como proteasa específica. Se aceptaron péptidos con un puntaje de Protein Lynx Global Server (PLGS) de >95% de confianza como correcto. El umbral de puntuación en las condiciones anteriores fue de 52 para  $p < 0.05$ .

### 4.4.4 Extracción de proteínas para su caracterización térmica por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y obtención de membranas de nanofibras por electrohilado

La extracción de proteínas para DSC se realizó de acuerdo al procedimiento publicado por Chronakis y colaboradores, con algunas modificaciones, como se informa en la sección 2.3.3.2. Después de la centrifugación, el sobrenadante que contenía las proteínas extraídas y liberadas durante el pretratamiento se recogió y se ajustó a pH 3.0, con HCl 1.0 N, para la precipitación máxima de proteínas. La suspensión se centrifugó a 3000 x g durante 15 min. El sedimento que contenía las proteínas se liofilizó y se almacenó a 4 °C hasta su uso.



### 4.4.5 Solubilidad de proteínas

Para el análisis de la solubilidad de las proteínas, los aislados de proteína se disolvieron (1 mg/ml en concentrado) en buffers ajustados a pH's de 2–10 y se agitaron a temperatura ambiente, durante 30 min. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos, a 10 000 x g a 10 ° C. El sobrenadante se recogió para determinar el contenido de proteínas, mediante el método de Markwell [232]. La solubilidad se expresó como porcentaje (g de proteína soluble/100 g de aislado en la muestra).

### 4.4.6 Concentración de grupos disulfuro y sulfhidrilo

La concentración de los grupos disulfuro y sulfhidrilo en los aislados de proteínas se determinó usando el método desarrollado por Beveridge y colaboradores [233] y Thannauser y colaboradores [234], respectivamente. Las muestras de aislado (1 mg/mL) se suspendieron en 0.086 mol/L Tris-HCl, 0.09 mol/L glicina, 4 mmol/L EDTA, 8 mol/L urea, pH 8 buffer. Las dispersiones se agitaron a 25 °C, durante 10 min, a 500 rpm en un termomezclador y luego se centrifugaron a 15 000 x g (10 min, 10 °C). El sobrenadante se incubó con el reactivo de Ellman (4 mg DTNB/mL de metanol) y se usó 1 ml de NTSB en el caso de los sulfhidrilos totales. Se midió la absorbancia a 412 nm, en un espectrofotómetro Genesys-20 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para conocer la concentración de grupos disulfuro y sulfhidrilo se usó el coeficiente de extinción molar del 3-tio-6-nitrobenzoato (TNB; 13, 600 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). La concentración de proteína de los extractos se determinó mediante el método de Markwell [232].

### 4.4.7 Identificación térmica de proteínas por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se usó calorimetría diferencial de barrido para determinar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) y la entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ ) de las proteínas extraídas y de la biomasa de microalgas. El comportamiento térmico de las proteínas y de la biomasa se investigó con un calorímetro TA Instruments Q20 DSC (TA Instrument, New Castle, Delaware, EE. UU.). Para llevar a cabo los análisis, se prepararon recipientes de aluminio sellados herméticamente que contenían entre 2 y 8 mg de muestra de proteína, las cápsulas se escanearon de la siguiente manera: (a) enfriado desde temperatura ambiente hasta -50 °C, isoterma durante 5 minutos a -50 °C para eliminar la humedad residual y elevar el historial térmico, b) calentar a temperatura ambiente a 10 °C/min, mantener durante 5 minutos a temperatura ambiente y c) calentar hasta 350 °C a 10 °C/min para registrar el comportamiento térmico. Todas las mediciones de DSC se llevaron a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de flujo de 50 mL/min. Los valores de  $T_g$ ,  $T_d$  y  $\Delta H_d$  se obtuvieron mediante el software Universal Analysis (TA Instruments, New Castle, Delaware, EE. UU.). Se consideró que la  $T_g$  era el punto de inflexión de la línea base, causada por la discontinuidad del calor específico de la muestra.

## 4.5 Obtención de bioplásticos a base de biomasa de los consorcios D y S

### 4.5.1 Preparación de bioplásticos

Los materiales bioplásticos se obtuvieron mediante un método de dos etapas. En primer lugar, la biomasa de microalgas y el plastificante (glicerol) fueron mezclados en una proporción de proteína /plastificante 60/40. El mezclador utilizado fue un reómetro contrarrotatorio de dos paletas (Haake PolyLab QC, ThermoHaake), que permite el control de ambos valores: temperatura y torque. Las mezclas de tipo masa se obtuvieron después de mezclar por 5 minutos, a 25 °C y 50 rpm. Las mezclas de biomasa/plastificante se sometieron a un proceso de moldeo por inyección, para

obtener las probetas bioplásticas. Se utilizó una máquina de moldeo por inyección MiniJet II (ThermoHaake, Alemania) a escala laboratorio. Se obtuvieron muestras rectangulares ( $60 \times 10 \times 1$  mm) a una presión de inyección de 500 bar durante 20 s, y una presión de retención de 200 bar, durante 200 s. La temperatura de la cámara de inyección fue de  $60$  °C en todos los casos, mientras que se probaron tres diferentes temperaturas de molde ( $80$ ,  $100$  y  $120$  °C).

### 4.5.1.1 Reología de la mezcla biomasa/plastificante

La mezcla de biomasa de microalgas y glicerol se caracterizó por mediciones de corte oscilatorio de pequeña amplitud (SAOS), con un reómetro de tensión controlada (AR200, TA Instruments, Newcastle, USA), para establecer el rango de viscoelasticidad lineal a las temperaturas de molde seleccionadas. La geometría utilizada fue una placa y una geometría de placa (diámetro: 40 mm) con una superficie rugosa y un espacio entre placas de 20 mm. Las pruebas de rampa de temperatura se llevaron a cabo de la siguiente manera: (a) las muestras se calentaron desde  $25$  °C hasta la temperatura de molde ( $80$ ,  $100$  o  $120$  °C) a  $5$  °C/min, b) isoterma durante 300 s a la temperatura de molde ( $80$ ,  $100$  y  $120$  °C) y c) enfriamiento de la mezcla de la temperatura de molde ( $80$ ,  $100$  o  $120$  °C) hasta  $25$  °C a  $5$  °C/min. Se realizaron pruebas de barrido de tiempo por 1800 s a la temperatura seleccionada manteniéndola constante. Durante estas mediciones, la viscosidad compleja ( $\eta^*$ ) se monitoreo a una frecuencia constante de  $2\pi$  rad/s. Todos los sistemas estudiados tenían la misma historia termoreológica antes de realizar cualquier prueba.

## 4.6 Obtención de biocompositos a partir de biomasa residual de los consorcios D y S

La biomasa residual de microalgas utilizada como materia prima para la obtención de biocompositos se obtuvo a partir del pretratamiento con ultrasonido u ozono y la extracción de proteínas. Para este fin, se llevó a cabo el análisis de la composición de la biomasa residual de microalgas.

### 4.6.1 Caracterización de la biomasa residual

#### 4.6.1.1 Contenido de cenizas

Para obtener el contenido de cenizas, 300 mg de biomasa en un crisol a peso constante se llevaron a una mufla por 5 h a  $550$  °C. El contenido de cenizas se determinó como % en peso seco. Se realizaron al menos 3 réplicas.

#### 4.6.1.2 Contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad, 300 mg de biomasa en un crisol a peso constante se llevaron a una estufa por 24 h a  $100$  °C. El contenido de humedad se determinó como % en peso seco. Se realizaron al menos 3 réplicas.

#### 4.6.1.3 Contenido de lípidos

El contenido de lípidos se determinó mediante el método Soxhlet. 300 mg de muestra se depositaron en un cartucho y se sometieron a extracción por al menos 1 h. El solvente utilizado fue hexano. El contenido de lípidos se determinó como % en peso seco. Se realizaron al menos 3 réplicas.

### 4.6.1.4 Contenido de proteínas

El contenido de proteínas se determinó mediante el método de Dumas, que se basa en la pirólisis completa de la muestra y medición del contenido de nitrógeno de los gases de combustión. El contenido de proteínas se determinó como % en peso seco. Se realizaron al menos 3 réplicas.

### 4.6.1.5 Contenido de carbohidratos

El análisis del contenido de carbohidratos se llevó a cabo mediante el método de fenol-sulfúrico reportado en la sección 2.3.3.3. El contenido de carbohidratos se determinó como % en peso seco. Se realizaron al menos 3 réplicas.

### 4.6.2 Preparación de biocompositos

Los biocompositos se obtuvieron siguiendo los mismos dos pasos utilizados para la obtención de bioplásticos. La relación proteína/plastificante se mantuvo constante (60/40), el polímero sintético (policaprolactona) PCL se introdujo para producir mezclas con 5, 10, y 20% en peso de PCL en la mezcla resultante. Las mezclas de tipo masa se obtuvieron después de mezclar por 5 minutos, a 60 °C y 50 rpm. En cuanto a la etapa de moldeo por inyección, también se obtuvieron muestras rectangulares (60 × 10 × 1 mm) a una presión de inyección de 500 bar durante 20 s, y una presión de retención de 200 bar durante 200 s, la temperatura de la cámara de inyección en este caso fue de 70 °C, mientras que se probaron tres diferentes temperaturas de molde (80, 100 y 120 °C).

#### 4.6.2.1 Análisis térmico mecánico dinámico (DMTA) de las mezclas biomasa/glicerol/PCL

Las propiedades viscoelásticas:  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$  ( $\tan \delta = G''/G'$ ) de las mezclas se realizaron con un reómetro RSA3 (TA Instrumentos, Estados Unidos). Se realizaron pruebas de barrido de frecuencia de 0.02 a 20 Hz a temperatura constante.

### 4.7 Caracterización de los materiales obtenidos

#### 4.7.1 Análisis mecánico dinámico (DMA)

La caracterización reológica de las probetas se realizó por medio de pruebas de DMA, con un reómetro Discovery-HR-3 (TA Instrumentos, Estados Unidos). Se seleccionó una geometría de torsión rectangular para estas pruebas de flexión oscilatoria. Se realizaron pruebas de barrido de frecuencia de 0.02 a 20 Hz a temperatura constante (30 °C) y pruebas de rampa de temperatura de 25 hasta 140 °C a 3 °C/min y 1 Hz, tanto para bioplásticos como biocompositos. Ambas pruebas se llevaron a cabo dentro de la región viscoelástica lineal.

#### 4.7.2 Pruebas de tracción

Se realizaron pruebas de tracción uniaxiales hasta alcanzar la ruptura de las probetas mediante un reómetro RSA3 con una geometría rectangular (TA Instrumentos, Estados Unidos). Inicialmente se obtuvieron curvas de tensión-deformación y, posteriormente, se obtuvieron tres parámetros de estas curvas: módulo de Young ( $E$ ), esfuerzo máximo ( $\sigma_{max}$ ) y deformación a la rotura ( $\epsilon_r$ ). La velocidad de deformación seleccionada fue de 10 mm/min. Todas las pruebas tanto para bioplásticos como biocompositos se realizaron a temperatura ambiente.

### 4.7.3 Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua de bioplásticos y biocompositos se determinó de acuerdo al método descrito por Cuadri y colaboradores [232]. Las probetas se secaron durante la noche en un horno a 50 °C (peso seco inicial). Después se introdujeron en agua destilada durante 24 h (peso húmedo). Finalmente, las probetas se sometieron nuevamente a un proceso de secado (peso seco final). La capacidad de absorción de agua y la pérdida de material soluble se determinaron mediante las siguientes ecuaciones [232].

$$\text{Capacidad de absorción de agua} = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco final}}{\text{Peso seco final}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Pérdida de material soluble} = \frac{\text{Peso seco inicial} - \text{Peso seco final}}{\text{Peso seco inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

## 4.8 Obtención de membranas de nanofibras por electrohilado a partir de proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ultrasonido u ozono

### 4.8.1 Solución de acetato de celulosa (AC)

El acetato de celulosa (contenido de acetilo 39.8%, MW=30,000) fue comprado en Aldrich Co. y el ácido acético (N 99%) se adquirieron de Duksan Pure Chemical Co. (Corea). Mediante estudios previos realizados por el grupo de Tecnología y Diseño de Productos Multicomponentes de la Universidad de Sevilla, se determinó que la concentración óptima para obtener membranas de nanofibras por electrohilado a partir de acetato de celulosa es 17% p/p. Por lo tanto se realizó una disolución madre al 34% p/p con acetato de celulosa y ácido acético al 80%, para, de esta forma, obtener disoluciones al 17% p/p diluyendo con ácido acético al 80% o bien la solución de proteína adecuada. Debido a la alta viscosidad del acetato de celulosa, la mezcla se agitó durante 24 horas, acompañada de un ligero aumento de temperatura, para poder obtener una solución completamente homogénea.

### 4.8.2 Solución de proteína del consorcio D en ácido acético al 80%

Para obtener las soluciones de proteína en ácido acético, 5 g de aislado de proteína se disolvieron en 15 mL de ácido acético al 80% y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos, a 10 000 x g y 10 °C. El sobrenadante se recogió para su caracterización fisicoquímica, y determinar el contenido de proteínas mediante el método Kjeldahl, la solubilidad se expresó como porcentaje (g de proteína soluble/100 g de aislado en la muestra).

### 4.8.3 Preparación de soluciones de proteína y AC 17%/proteína

Para llevar a cabo el electrohilado, se prepararon las soluciones que se muestran en la Tabla 7 para cada concentrado de proteína, se mezcló la cantidad necesaria de solución madre de AC al 34% p/p y solución madre de proteína.

## 4. Metodología Experimental

**Tabla 7.** Soluciones de AC/proteína electrohiladas.

Solución	Concentración de AC (%)	mL de solución de proteína
1	17	5
2	17	2.5
3	17	1.25
4	17	0.75

Se tenían cuatro concentrados de proteína de biomasa del consorcio D: concentrado de proteína de biomasa sin pretratamiento, concentrado de proteína de biomasa pretratada con ultrasonido a una energía aplicada de 50 kWh/kg de biomasa seca, concentrado de proteína de biomasa pretratada con ultrasonido a una energía aplicada de 125 kWh/kg de biomasa seca y concentrado de proteína de biomasa pretratada con ozono a una concentración de 9 mg O<sub>3</sub>/L. Se eligieron estas condiciones de pretratamiento, ya que son las que presentaron mayor rendimiento de recuperación de proteínas. El total se trabajó con 4 disoluciones de proteína y 16 soluciones de AC 17%/proteína.

### 4.8.4 Caracterización de soluciones de proteína y AC 17%/proteína

Primero, se determinaron las propiedades físicas de todas las soluciones para estudiar su influencia sobre las membranas obtenidas. El pH se determinó con un medidor de pH (CyberScan pH1500, Eutech), la conductividad eléctrica mediante un conductímetro (EC-Meter Basic 30+, Crison) y la tensión superficial mediante un tensiómetro (Sigma 701, Dyne). La mediciones de tensión superficial se realizaron con una placa rectangular estándar (placa Wilhelmy) suspendida verticalmente a una balanza de precisión. La parte inferior del plato se puso en contacto (horizontalmente) con la superficie del líquido. Entonces, se ejerció una fuerza vertical en el plato para levantarlo. La placa se levantó gradualmente, y en cada lado se había formado una interfaz curva. Por otro lado, se realizaron mediciones reológicas para determinar la viscosidad de las soluciones en función de la velocidad de corte. Para llevar a cabo estas mediciones, las muestras se colocaron en geometría de placas paralelas lisas de 60 mm (espacio de 1 mm), la temperatura se ajustó a 25 °C. La ventana de velocidad de corte se estableció entre 1 y 100 s<sup>-1</sup>. Estas mediciones se llevaron a cabo en un reómetro de tensión controlada (AR200, TA Instruments, Newcastle, USA).

### 4.8.5 Procesamiento y caracterización de membranas AC 17%/proteína

Las membranas se obtuvieron con una configuración de electrohilado horizontal, con jeringas BD Luer-Lock de 10 ml, y agujas de acero inoxidable 22 G (diámetro interno 0.5 mm). Las membranas obtenidas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) (JEOL 6460LV) después de recubrir las muestras con oro en un equipo sputter (EM ACE600, Leica). En el microscopio JEOL se obtuvieron imágenes de la superficie de las muestras a escalas micro y nanométricas. El diámetro de las fibras obtenidas para cada sistema se midió mediante un software de análisis de imágenes (Image J), que es un programa de procesamiento de imágenes de dominio público de Java. El coeficiente de variación también se calculó para comparar las distribuciones normales obtenidas de los diferentes sistemas estudiados. Además, de obtuvieron los espectros de infrarrojo de las muestras, para comprobar la presencia de proteína en la

membranas. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con un espectrofotómetro Nicolet Magna-IR 560.

### **4.9 Obtención de membranas de nanofibras por electrohilado a partir de proteínas de biomasa de microalgas del consorcio S pretratada con ultrasonido u ozono**

#### **4.9.1 Solución de poli (óxido de etileno) (PEO)**

Mediante estudios previos realizados por el grupo de Tecnología y Diseño de Productos Multicomponentes de la Universidad de Sevilla, se determinó que la concentración óptima para obtener membranas de nanofibras por electrohilado de PEO es 3.5 % p/p. Por lo tanto se realizó una disolución madre al 7% p/p con PEO y agua destilada, para obtener disoluciones al 3.5% diluyendo con agua o bien la solución de proteína adecuada. Debido a la alta viscosidad del PEO, la mezcla se agitó durante 24 horas, acompañada de un ligero aumento de temperatura, para poder obtener una solución completamente homogénea. El PEO utilizado (PEO, 600 kDa peso molecular promedio) fue adquirido de Sigma-Aldrich (EE. UU.).

#### **4.9.2 Soluciones de proteína del consorcio S**

Mediante el estudio de solubilidad de los concentrados de proteína se determinó que tanto los concentrados de proteína de biomasa pretratada como el concentrado de proteína de biomasa sin pretratamiento presentaban un mayor porcentaje de disolución. Se usó el buffer Tris base a pH 8.94 como disolvente. Por lo tanto este fue el buffer utilizado para obtener las soluciones de proteína. Para preparar el buffer se disolvieron 0.605 g de Tris base en aproximadamente 450 ml de agua ultrapura. Posteriormente se añadieron 4.45 g de NaCl, se ajustó el pH a 8.94 con una base fuerte o ácido monovalente según sea necesario. Finalmente se completó el volumen a 500 ml con agua ultrapura.

Para preparar la solución madre de proteínas se pesa la cantidad necesaria de concentrado de proteína para preparar 20 mL de solución con concentración final de 5% p/p (teniendo en cuenta el porcentaje de disolución del concentrado). El concentrado de proteína pesado se disuelve en 15 mL de buffer Tris base y se ajusta a pH 8.94, con un ácido o base fuerte, según sea necesario. Finalmente se ajusta el volumen a 20 mL con buffer Tris base. La solución se agita por 30 min para homogenizar, se centrifuga la disolución por 10 min a 5 °C y 15 000 x g. Tras el centrifugado, se consigue la concentración deseada del 5% de proteína. Una vez preparada la disolución, se añade una punta de espátula de azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) para prevenir el crecimiento bacteriano.

#### **4.9.3 Preparación de soluciones de proteína y PEO 3.5%/proteína**

Para llevar a cabo el electrohilado se preparan las soluciones que se muestran en las Tablas 8 y 9. Para cada concentrado de proteína se mezcló la cantidad necesaria de buffer Tris base y solución madre de proteína al 5% p/p o bien de solución madre de PEO al 7% p/p y solución madre de proteína al 5% p/p, según sea el caso.

---

## 4. Metodología Experimental

---

**Tabla 8.-** Concentración de las soluciones de proteína del consorcio S electrohiladas.

Solución	Concentración de proteína (%)
1	5
2	2.5
3	1.25

**Tabla 9.-** Concentración de las soluciones de PEO/proteína electrohiladas.

Solución	Concentración de PEO (%)	Concentración de proteína (%)
4	3.5	2.5
5	3.5	1.25
6	3.5	0.75

Se tenían tres concentrados de proteína de biomasa del consorcio S: concentrado de proteína de biomasa sin pretratamiento, concentrado de proteína de biomasa pretratada con ultrasonido a una energía aplicada de 200 kWh/kg de biomasa seca y el concentrado de proteína de biomasa pretratada con ozono a una concentración de 9 mg O<sub>3</sub>/L. Se eligieron estas condiciones de pretratamiento ya que son las que presentaron mayor rendimiento de recuperación de proteínas. El total se trabajó con 9 disoluciones de proteína y 9 disoluciones PEO 3.5%/proteína.

### 4.9.4 Caracterización de soluciones de proteína y PEO 3.5%/proteína

Las soluciones de proteína y PEO 3.5%/proteína se caracterizaron físicamente mediante los procedimientos descritos en la sección 2.8.4

### 4.9.5 Procesamiento y caracterización de membranas PEO 3.5%/proteína

El procesamiento y caracterización de las membranas se llevó a cabo mediante los procedimientos descritos en la sección 2.8.5.

Adicionalmente se realizaron pruebas de tracción mediante la metodología descrita en la sección 2.6.2. Inicialmente, se obtuvieron curvas de tensión-deformación y posteriormente se obtuvieron tres parámetros de estas curvas: módulo de Young (E), tensión máxima ( $\sigma_{\max}$ ) y tensión en la rotura ( $\epsilon_r$ ). Todos los análisis se realizaron al menos por triplicado.

## 4.10 Pretratamiento combinado de ultrasonido y ozono para la recuperación de biocomponentes microalgales y fósforo

### 4.10.1 Diseño de experimentos

El análisis estadístico se realizó mediante software estadístico (Statgraphics Centurion XVI, Statgraphics Technologies, The Plains, VA). Se utilizó un diseño de experimentos basado en una

---

## 4. Metodología Experimental

---

metodología de superficie de respuesta. El diseño de experimentos del pretratamiento combinado de ultrasonido y ozono fue basado en los resultados preliminares encontrados sobre el efecto individual de los pretratamientos de ultrasonido y ozono. El objetivo del pretratamiento combinado fue intensificar el proceso de recuperación de lípidos, proteínas, carbohidratos y fósforo de microalgas. El pretratamiento combinado diseñado consistió en ultrasonido para inducir la disrupción celular, liberar proteínas a la fase acuosa y extraer lípidos seguidos de ozono, para recuperar carbohidratos y fósforo. En el pretratamiento combinado durante el ultrasonido se aplicaron los parámetros experimentales que proporcionaron una buena respuesta tanto para la recuperación de lípidos como de proteínas. Estos parámetros se obtuvieron de acuerdo a la función e deseabilidad para la obtención de respuestas múltiples. Para el ozono se diseñó un nuevo experimento para la recuperación de carbohidratos y fósforo. Los parámetros experimentales evaluados para el ozono en el pretratamiento combinado fueron: concentración de ozono en cuatro niveles (9, 15, 21 y 27 mg O<sub>3</sub>/L), tiempo de contacto en tres niveles (15, 25 y 35 min) y pH en dos niveles (8 y 11) que implican 24 experimentos. En el pretratamiento combinado, se aplicó la función de deseabilidad del ozono para encontrar una combinación de los parámetros experimentales que proporcionaban la máxima eficiencia, tanto para la recuperación de carbohidratos como de fósforo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El análisis de varianza (ANOVA) también se realizó para identificar parámetros operativos significativos. Los efectos de los parámetros se consideraron significativos a un nivel del 95% ( $p < 0.05$ ).

### 4.10.2 Extracción y cuantificación de biocomponentes

La extracción y cuantificación de biocomponentes se realizó mediante los métodos descritos en la sección 4.3

#### 4.10.2 Análisis de fósforo

El porcentaje de TP y orto-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> liberados a la solución durante el proceso de recuperación de fósforo se evaluó mediante los procedimientos presentados en la Tabla 6.



# RESULTADOS y DISCUSIÓN

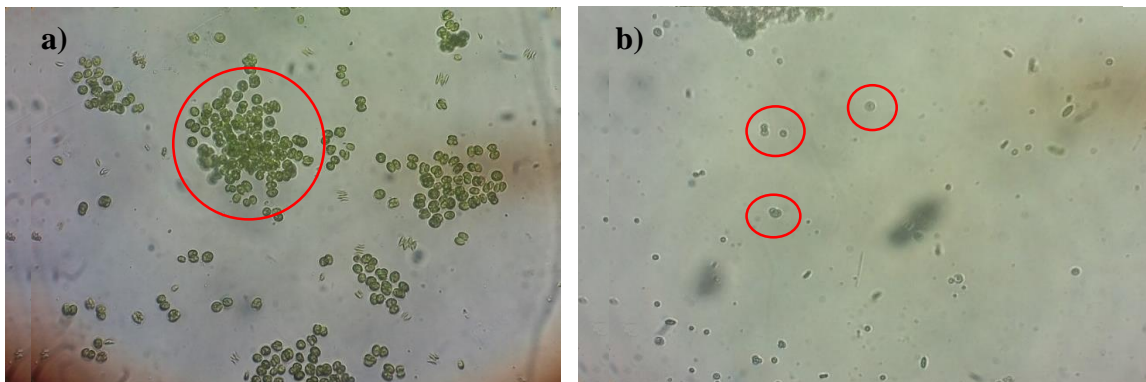
### 5. RESULTADOS y DISCUSIÓN

#### 5.1 Cultivo de biomasa de microalgas

##### 5.1.1 Cultivo de biomasa del consorcio D

Durante todo el proceso experimental, las microalgas se cultivaron en reactores de 10 litros, la concentración inicial en los reactores fue de  $200 \pm 20$  mg/L, y el periodo de cultivo fue de 27 días. Se monitorearon las propiedades fisicoquímicas del cultivo, así como su composición al microscopio. La observación de los cultivos al microscopio permitió identificar la aparición de cianobacterias, así como de dos microorganismos nuevos que presentaban diferente morfología a la de la microalga inoculada (*Desmodesmus sp.*). Para identificar estos microorganismos, se tomó una muestra de agua residual sin inocular y se le dio el mismo tratamiento que a los cultivos de microalgas. Después de ocho días bajo irradiación con lámparas de fluorescencia se observó crecimiento de microorganismos en el agua residual sin inocular. La identificación de estos microorganismos mediante morfología permitió clasificarlos dentro del género *Mychonastes*. Por lo tanto, se concluyó que la principal fuente de procedencia de esta microalga es el agua residual, Figura 13a. Las especies del género *Mychonastes* son microalgas verdes, constituyen pequeñas algas esféricas, ovoides o elipsoidales; se encuentran en forma solitaria o colonias. Son uno de los grupos más abundantes de microalgas del fitoplancton de agua dulce y salobre [236]. Las microalgas del género *Mychonastes* son un buen candidato para la producción de biodiesel, debido a que pueden llegar a generar contenido de lípidos de hasta 50% [237].

Por otra parte se tomó una muestra del cultivo contaminado para la identificación de los microorganismos presentes en mayor concentración. Los análisis dieron como resultado que estos microorganismos son del género *Chlorococcum*. No existe fuente de procedencia aparente para estos microorganismos, sin embargo, pueden contaminarse vía aérea. El género *Chlorococcum* se compone de microalgas verdes, son células elipsoidales o esféricas con paredes celulares suaves y dimensiones variables. Pueden acumular gran cantidad de lípidos. En estudios recientes se reporta que pueden llegar a acumular hasta 65% de lípidos en condiciones de atmosfera de nitrógeno y deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo, por lo cual pueden llegar a ser cultivadas para la producción de biodiesel, Figura 13b [238].

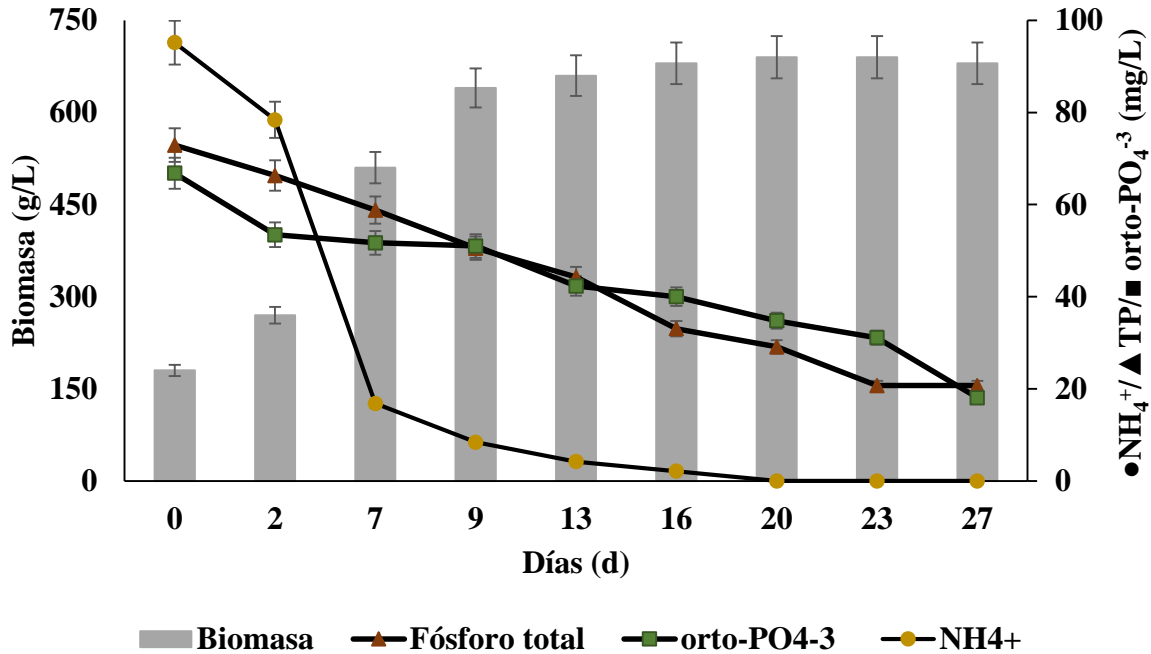


**Figura 14.** Cultivos del consorcio D con a) *Mychonastes* y b) *Chlorococcum* (x40).

Como resultado, los cultivos contenían 85% de *Desmodesmus sp.*, 5% *Mychonastes sp.*, 5% *Chlorococcum sp.* y 5% cianobacteria. Por lo tanto, la biomasa de este consorcio de microalgas rico en *Desmodesmus sp.*, fue nombrado a lo largo de la tesis como consorcio D. Durante el proceso de cultivo del consorcio D se observó que la tasa de crecimiento aumentó de forma exponencial en los primeros 9 días de cultivo. A partir del día 9, la tasa de crecimiento disminuyó debido a que la concentración de nitrógeno amoniacal fue menos de 9 mg/L. Aunque se tiene presencia de nitrógeno en forma de nitratos a partir del día 9 de cultivo, la tasa de

## 5. Resultados y Discusión

remoción de nutrientes disminuye considerablemente. La razón por la que disminuye es que a partir de este día las microalgas se alimentan con nitratos. El amoníaco es utilizado directamente por las microalgas para sintetizar aminoácidos, mientras que los nitratos tienen que ser convertidos a amoníaco para así poder sintetizar aminoácidos, lo cual es un proceso más largo, al final de la etapa de cultivo se removió el 100% de nitrógeno amoniacal, Figura 14.



**Figura 15.** Curva de crecimiento de biomasa del consorcio D y remoción de  $\text{NH}_4^+$ , TP y orto- $\text{PO}_4^{-3}$ .

Por otra parte, según la literatura, la remoción de ortofosfatos es dependiente de la remoción de nitrógeno. Para el caso del consorcio D se requieren 6 mg/L de nitrógeno amoniacal por cada mg/L de ortofosfatos removido. Estos datos se obtienen al día 9 de cultivo, ya que después de este día el suministro de nitrógeno en el medio de cultivo no solamente es función de nitrógeno amoniacal, sino también del nitrógeno en forma de nitratos. Al final de la etapa de cultivo se removieron  $73 \pm 9\%$  de orto- $\text{PO}_4^{-3}$  y  $62 \pm 7\%$  de fósforo total. Para cultivar biomasa del consorcio D se requieren 97 mg de orto- $\text{PO}_4^{-3}$ /g de biomasa producida. Estos datos son importantes para poder llevar a cabo el balance de fósforo en la etapa de recuperación.

### 5.1.2 Cultivo de biomasa de microalgas del consorcio S

El seguimiento de los cultivos de *Scenedesmus obliquus* al microscopio mostró la aparición de células microalgales pertenecientes al género *Mychonastes*. Los cultivos de *Scenedesmus obliquus* estaban compuestos de 90% *Scenedesmus obliquus*, 5% *Mychonastes* y 5% cianobacteria sp. Como se mencionó con anterioridad, la fuente de procedencia es el agua residual que se usó como medio de cultivo, Figura 15. Nuevamente, debido a que la biomasa que se obtiene no se constituye de una sola especie de microalgas y la biomasa del consorcio es rica en *Scenedesmus obliquus*, fue nombrado consorcio S a lo largo de la tesis.

Durante el proceso de cultivo de biomasa del consorcio S se observó que la tasa de crecimiento aumentó de forma exponencial durante los primeros 16 días de cultivo. A partir del día 16, la tasa de crecimiento disminuyó debido a que la concentración de nitrógeno amoniacal es de 16 mg/L. De igual forma que para los cultivos del consorcio D a partir del día 16 de cultivo, la tasa de remoción de nutrientes disminuye debido a que los nitratos se vuelven su principal fuente de

## 5. Resultados y Discusión

nitrógeno. Al final de la etapa de cultivo se removió el 100% de nitrógeno amoniacal, Figura 16.

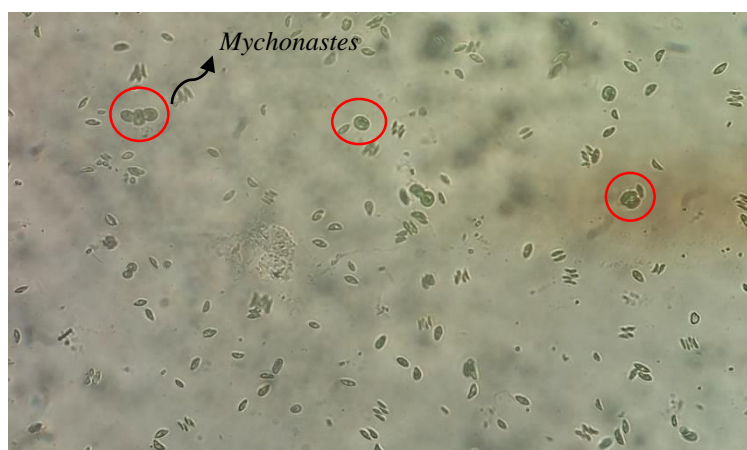


Figura 16. Cultivo del consorcio S contaminado con *Mychonastes* (x40).

Para el cultivo de biomasa del consorcio S se requieren 2.27 mg/L de nitrógeno amoniacal por cada mg/L de ortofosfatos removido. Estos datos se obtienen al día 16 de cultivo, ya que después de este día el suministro de nitrógeno es mediante los nitratos presentes. Al final del proceso de cultivo se removieron  $84 \pm 1\%$  de orto- $\text{PO}_4^{-3}$  y  $83 \pm 2\%$  de fósforo total, finalmente se requieren 68 mg de orto- $\text{PO}_4^{-3}$ /g de biomasa producida.

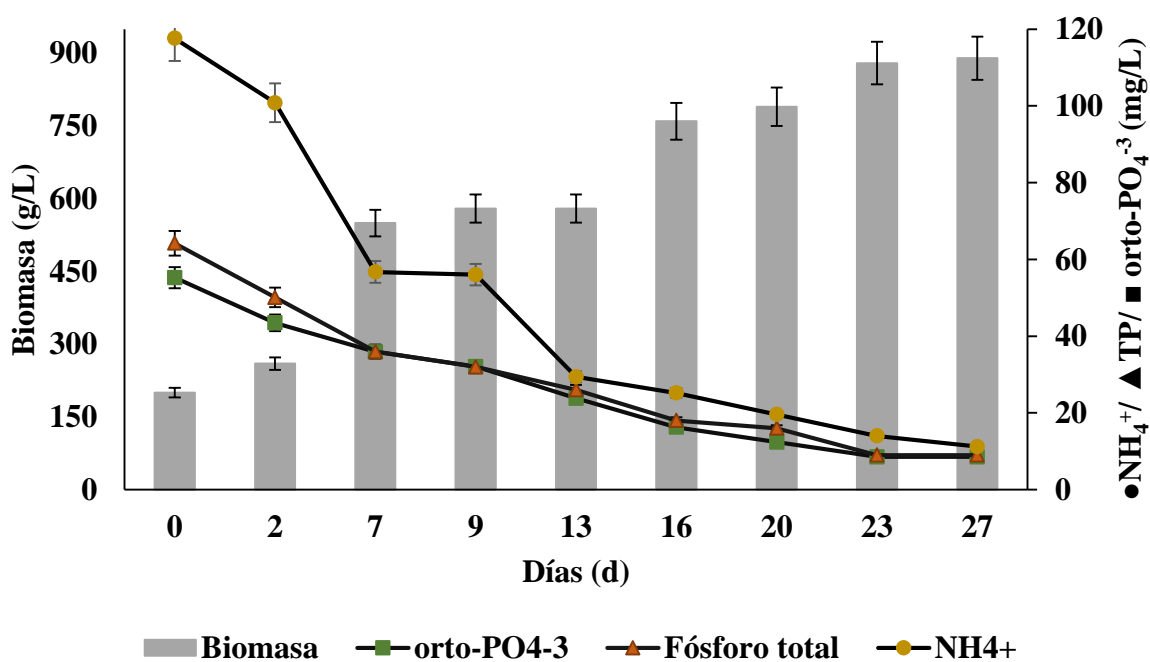


Figura 17. Curva de crecimiento del consorcio S y remoción de  $\text{NH}_4^+$ , TP y orto- $\text{PO}_4^{-3}$ .

## 5. Resultados y Discusión

### 5.2 Pretratamiento de biomasa de microalgas de los consorcios D y S con ultrasonido u ozono

#### 5.2.1 Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la disrupción celular y eficiencia de recuperación de biocomponentes

Solo la concentración de biomasa y la intensidad ultrasónica tuvieron un efecto significativo sobre el rendimiento de biocomponentes liberados de ambos consorcios, D y S, Tabla 10.

**Tabla 10.-** Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de proteínas, carbohidratos y lípidos liberados después del pretratamiento de biomasa de los consorcios D y S con ultrasonido (n=3).

Origen	Consorcio D			Consorcio S		
	Proteínas <sup>a</sup>	Carbohidratos <sup>b</sup>	Lípidos <sup>c</sup>	Proteínas <sup>d</sup>	Carbohidratos <sup>e</sup>	Lípidos <sup>f</sup>
	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P
Concentración de biomasa (g/L)	0.1043	0.7673	<b>0.0071</b>	0.4059	<b>0.0207</b>	<b>0.0003</b>
Energía aplicada (kWh/kg)	0.5788	0.8495	0.0579	0.7992	0.1013	0.1697
Intensidad ultrasónica (W/mL)	<b>0.0008</b>	<b>0.0043</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0051</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>

<sup>a</sup> Des Std: 16.13; error abs.: 9.33; <sup>b</sup> Des Std: 7.85; error abs.: 4.63;

<sup>c</sup> Des Std: 4.60; error abs.: 2.30; <sup>d</sup> Des Std: 15.57; error abs.: 8.18;

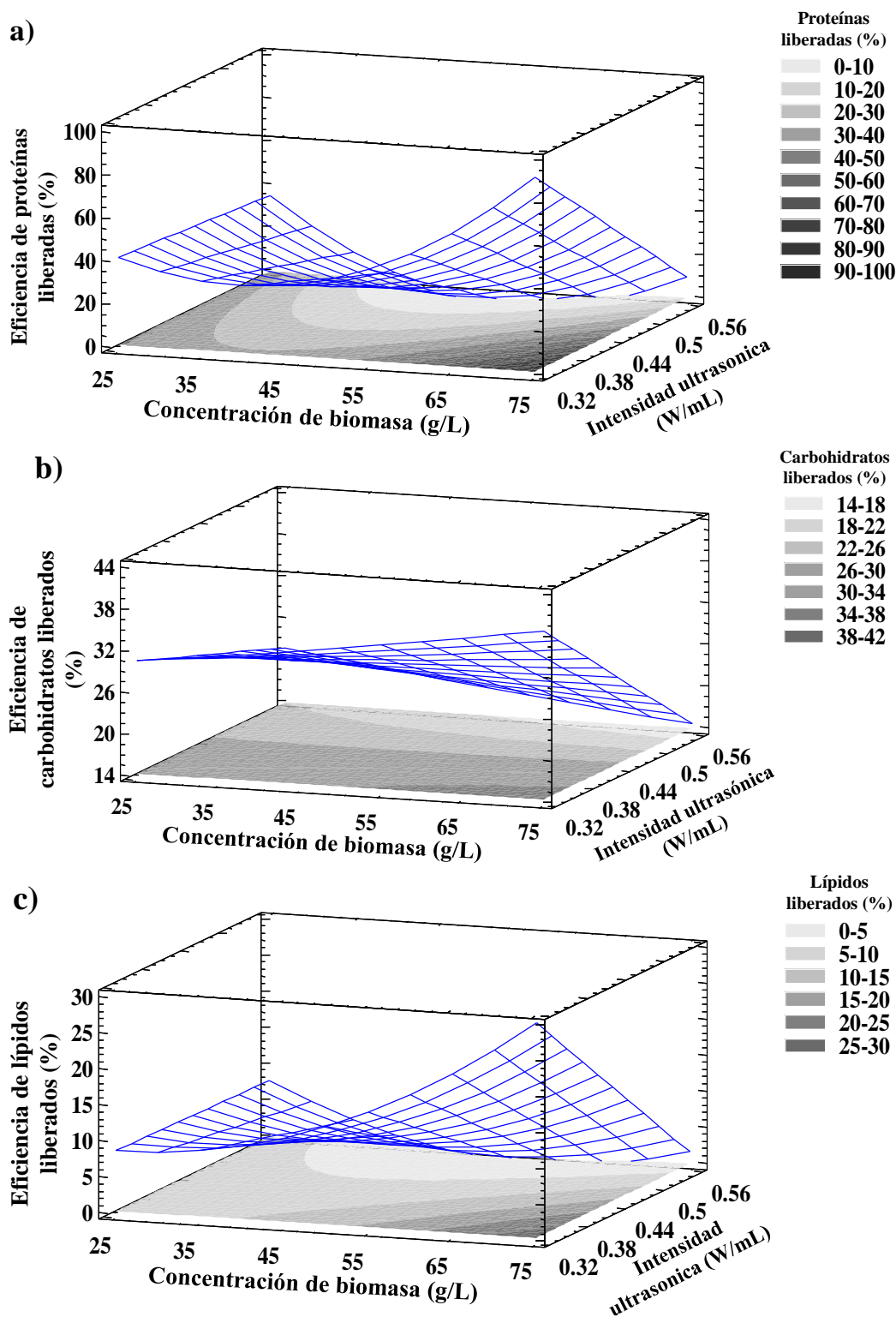
<sup>e</sup> Des Std: 3.75; error abs.: 2.08; <sup>f</sup> Des Std: 3.92; error abs.: 2.41.

Fuente en negrita denota  $p < 0.05$ .

La Figura 18 muestra la interacción de la concentración de biomasa (25-75 g/L) y la intensidad ultrasónica (0.32 y 0.53 W/L) para el rendimiento de liberación de biocomponentes del consorcio D. La concentración de biomasa tuvo un efecto positivo, ya que el aumento de la concentración de biomasa aumentó el rendimiento de los biocomponentes liberados (Figuras 18a, 18b, y 18c). Para todos los biocomponentes de ambos tipos de biomasa, los mayores rendimientos de biocomponentes liberados ( $94 \pm 5\%$  y  $99 \pm 3\%$  de proteínas,  $40 \pm 3\%$  y  $50 \pm 6\%$  de carbohidratos y  $26 \pm 1\%$  y  $42 \pm 7\%$  de lípidos para los consorcios D y S, respectivamente) se lograron con la concentración de biomasa más alta de 75 g/L. El proceso de ultrasonido se vuelve energéticamente más efectivo a altas concentraciones de biomasa, ya que la energía de ultrasonido tiene una atenuación insignificante en la fase acuosa y es más efectiva cuando está en contacto con materia sólida, como las células de microalgas [13]. Por lo tanto, a altas concentraciones de suspensión se promovió una mayor disrupción celular. Resultados similares fueron reportados por Zhang y colaboradores [239]. Ellos descubrieron que durante el pretratamiento con ultrasonido de *Trichosporon oleaginosus* para la recuperación de lípidos, una alta concentración de biomasa de 50 g/L aumentó la posibilidad de colisión entre las células, lo que mejoró la disrupción células. Silveira y colaboradores [240] informaron que una concentración de biomasa de 80 g /L resultó en la recuperación máxima de ficocianina de *Spirulina platensis*. Yao y colaboradores [241] informaron que la recuperación de lípidos en el nivel de  $73 \pm 8\%$  de biomasa de *Nannochloropsis sp.* se logró a una concentración de 120 g/L.

La intensidad ultrasónica tuvo un efecto negativo en el rendimiento de los biocomponentes liberados. El aumento de la intensidad ultrasónica de 0.32 a 0.53 W/mL redujo el rendimiento de 94% a 10% y de 99% a 47% para proteínas, de 40% a 15% y de 50 a 27% para carbohidratos y de 26% a 4% y de 42% a 8% para lípidos, Figura 18.

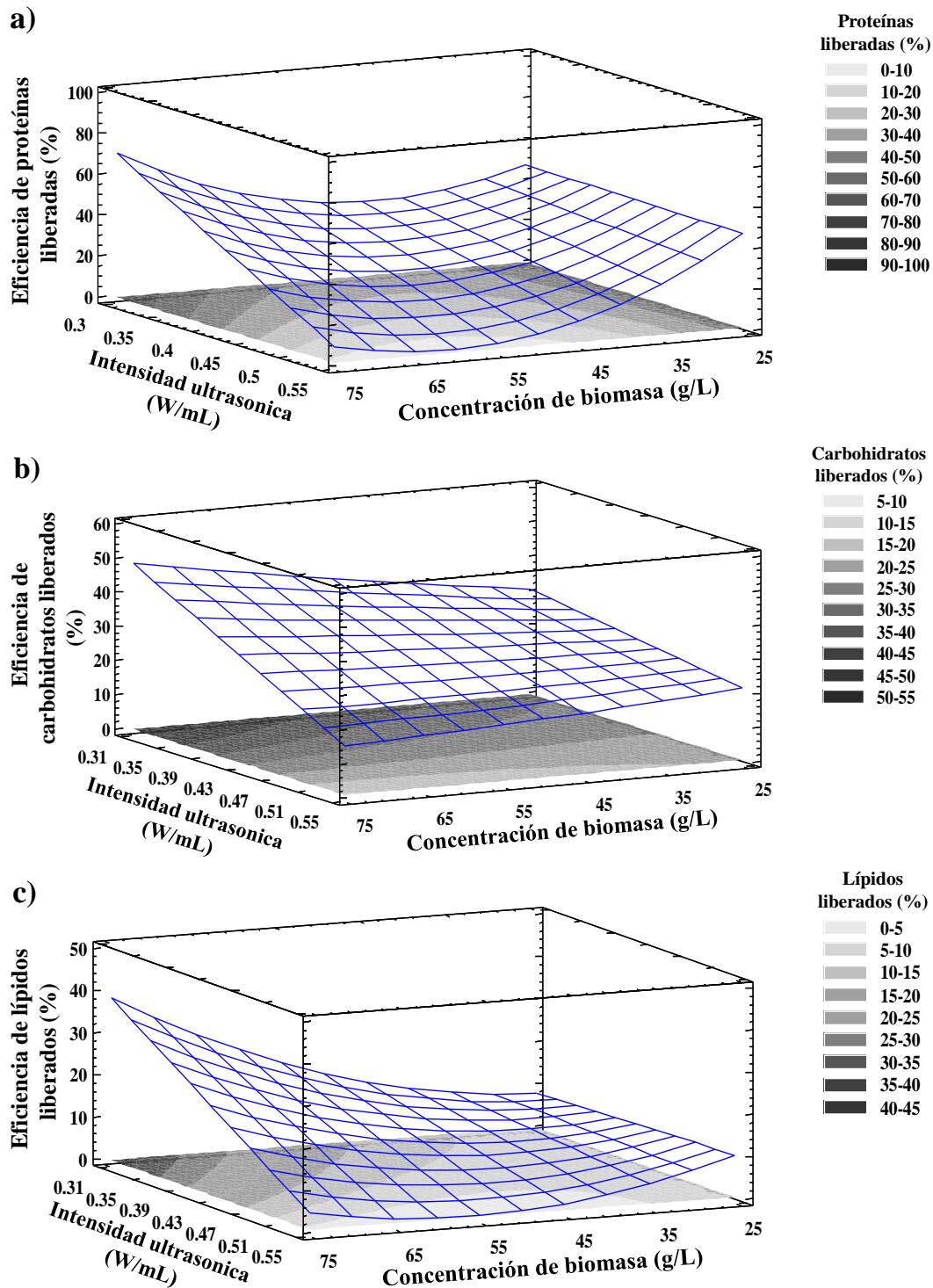
## 5. Resultados y Discusión



**Figura 18.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) proteínas, b) carbohidratos y c) lípidos de biomasa del consorcio D liberados en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado ( $n=3$ ) para cada conjunto de datos.

Debido a que el rendimiento de las proteínas liberadas fue un indicador de disrupción celular, se puede deducir que la intensidad ultrasónica de 0.53 W/mL, descrita también como pretratamiento con ultrasonido a alta potencia/tiempo corto, disminuyó considerablemente la disrupción celular.

## 5. Resultados y Discusión



**Figura 19.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) proteínas, b) carbohidratos y c) lípidos de biomasa del consorcio S liberados en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado ( $n=3$ ) para cada conjunto de datos.

Del mismo modo, para todos los biocomponentes, los mayores rendimientos de biocomponentes liberados se lograron a pretratamiento con ultrasonido de baja potencia/tiempo largo (intensidad ultrasónica de 0.32 W/mL). Esto es consecuencia de una reducción en el tiempo de operación con un aumento en la potencia de salida del baño de ultrasonido, debido a que la cavitación general y la energía liberada a la solución disminuyeron cuando disminuyó el tiempo de residencia de la suspensión de microalgas en la zona de sonicación activa. Esto enfatiza la importancia del tiempo en el pretratamiento con ultrasonido. El tiempo corto puede

## 5. Resultados y Discusión

conducir a la irrupción celular incompleta y el tiempo prolongado puede generar reacciones indeseables. La superficie de respuesta del rendimiento de (a) proteínas, (b) carbohidratos y (c) lípidos de biomasa del consorcio S liberados en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa se muestran en la Figura 19.

En contraste con los efectos del pretratamiento con ultrasonido sobre la disrupción celular, los parámetros estudiados tuvieron un impacto diferenciado en la eficiencia de recuperación de cada biocompuesto de biomasa del consorcio D, Tabla 11.

**Tabla 11.-** Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de proteínas, carbohidratos y lípidos recuperados después del pretratamiento de biomasa del consorcio D con ultrasonido (n=3).

Fuente	Proteínas <sup>a</sup>	Carbohidratos <sup>b</sup>	Lípidos <sup>c</sup>
	Valor P	Valor P	Valor P
Concentración de biomasa (g/L)	0.4225	0.2098	0.3941
Energía aplicada (kWh/kg)	0.8092	0.2383	<b>0.0269</b>
Intensidad ultrasónica (W/mL)	<b>0.0014</b>	0.0552	0.0728

<sup>a</sup> Des Std: 15.69; error abs: 9.11; <sup>b</sup> Des Std: 9.69; error abs: 5.87;

<sup>c</sup> Des Std: 10.10; error abs: 6.31. Fuente en negrita denota  $p < 0.05$ .

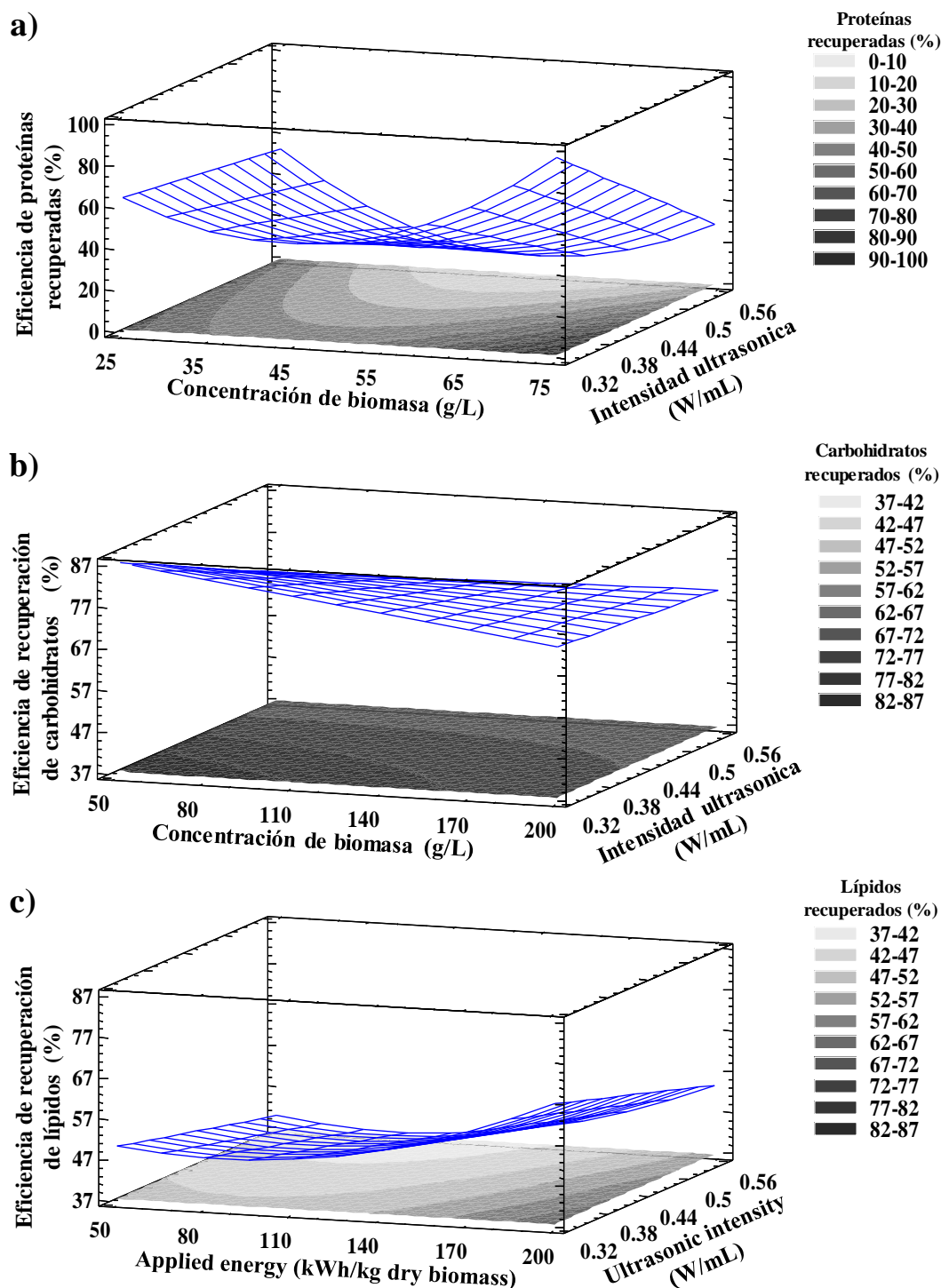
Solo la intensidad ultrasónica tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento de las proteínas recuperadas. Se observó que el rendimiento de recuperación de proteínas disminuye cuando la intensidad ultrasónica aumenta, Tabla 11. El mayor rendimiento de proteínas recuperadas ( $97 \pm 1\%$ ) se logró a las siguientes condiciones: concentración de biomasa más alta de 75 g/L, energía aplicada más baja de 50 kWh/kg de biomasa seca e intensidad ultrasónica más baja de 0.32 W/mL. En vista de la alta disrupción celular y el rendimiento de proteínas liberadas en solución (94%) a estas condiciones experimentales, alrededor del 3% de las proteínas totales en la biomasa se extrajeron mediante un método químico (pH 11, 40 °C durante 15 min) después del pretratamiento con ultrasonido, a estas condiciones experimentales se logró un  $97 \pm 1\%$  de eficiencia de recuperación, Figura 20a. Estos resultados coinciden con la disposición de los biocomponentes en la célula de microalgas. La mayoría de las proteínas son material intracelular y se pueden encontrar en forma libre o combinadas con pigmentos. Por lo tanto, la liberación y extracción de proteínas requiere la alteración de la pared celular, lo que se logró con el pretratamiento con ultrasonido [242]. A las condiciones aplicadas durante el experimento, la mayoría de las proteínas se liberaron a la fase acuosa, lo que intensifica significativamente el proceso de recuperación de proteínas, por lo que el proceso de extracción realizado después del pretratamiento con ultrasonido pudo haberse omitido.

Los parámetros estudiados no mostraron un efecto significativo sobre el rendimiento de los carbohidratos recuperados, Tabla 11. La cavitación por ultrasonido genera radicales y ondas de choque, sin embargo, las ondas de choque no pueden romper los enlaces covalentes. Esto sugiere que los radicales formados durante el pretratamiento reaccionaron con los carbohidratos almacenados en la pared celular de las microalgas y liberaron una fracción de carbohidratos a la fase acuosa. Como se mencionó anteriormente, en este estudio se liberaron  $40 \pm 3\%$  de la fracción de carbohidratos en la fase acuosa. El mayor rendimiento de carbohidratos recuperados ( $89 \pm 3\%$ ) se logró a la concentración de biomasa más alta de 75 g/L y la intensidad ultrasónica más baja de 0.32 W/mL, Figura 20b. La energía aplicada tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento de los lípidos recuperados, Tabla 11. Un aumento en la energía aplicada aumentó el rendimiento de los lípidos recuperados. El mayor rendimiento de los lípidos recuperados (85



## 5. Resultados y Discusión

$\pm 2\%$ ) se logró a la energía aplicada más alta de 200 kWh / kg de biomasa seca, la concentración de biomasa más alta de 75 g/L y la intensidad ultrasónica más baja de 0.32 W/mL, Figura 20c.



**Figura 20.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) proteínas, b) carbohidratos y c) lípidos de biomasa del consorcio D recuperados. Se muestran mediciones por triplicado ( $n=3$ ) para cada conjunto de datos.

En el caso de la recuperación de biocomponentes de biomasa del consorcio S, solo la intensidad mostró un efecto significativo sobre la recuperación de biocomponentes microalgales, Tabla 12.

## 5. Resultados y Discusión

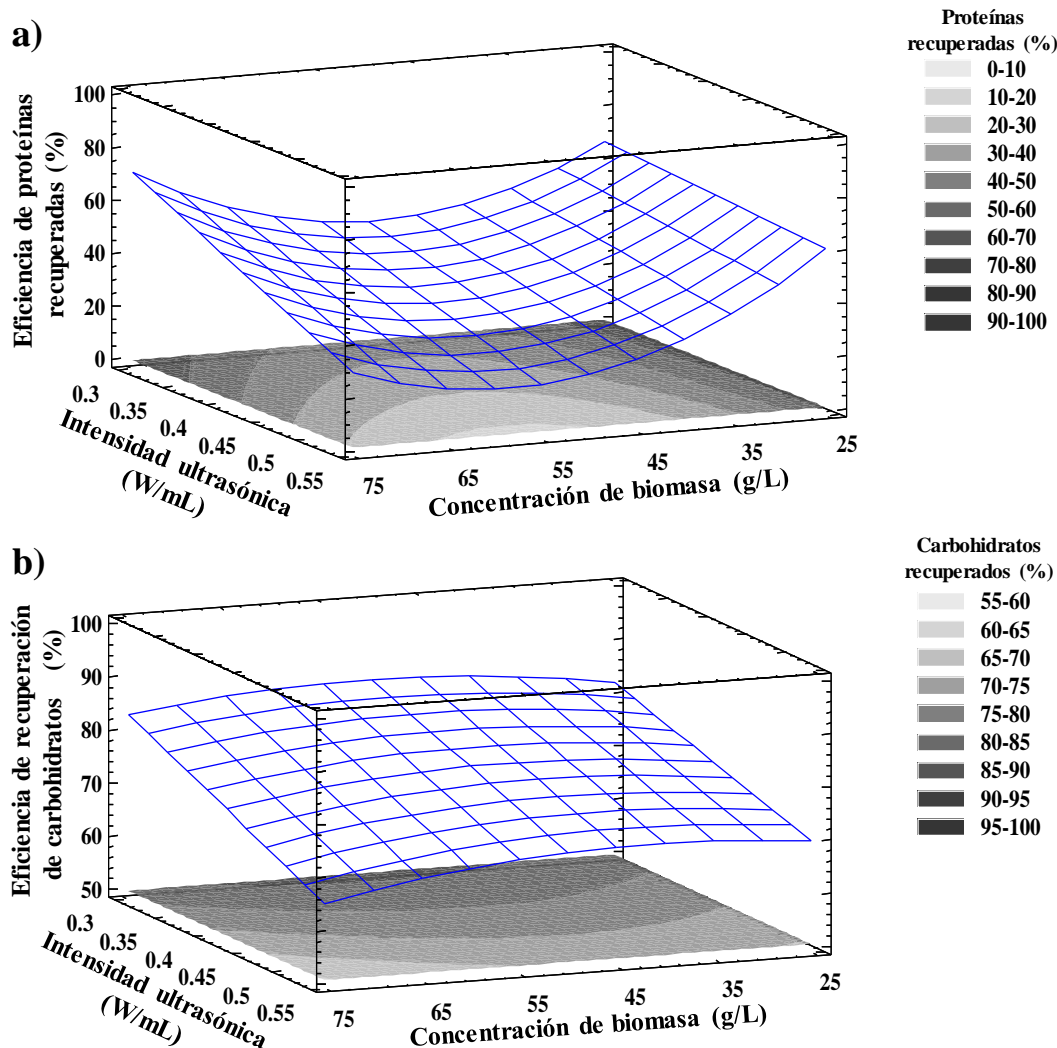
**Tabla 12.-** Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de proteínas, carbohidratos y lípidos recuperado después del pretratamiento de biomasa del consorcio S con ultrasonido (n=3).

Fuente	Proteínas <sup>a</sup>	Carbohidratos <sup>b</sup>	Lípidos <sup>c</sup>
	Valor P	Valor P	Valor P
Concentración de biomasa (g/L)	0.1441	0.7093	0.6209
Energía aplicada (kWh/kg)	0.6700	0.5853	0.8879
Intensidad ultrasónica (W/mL)	<b>0.0160</b>	<b>0.0154</b>	0.1172

<sup>a</sup> Des Std: 15.08; error abs: 8.27; <sup>b</sup> Des Std: 9.43; error abs: 5.71;

<sup>c</sup> Des Std: 17.95; error abs: 11.63. Fuente en negrita denota  $p < 0.05$ .

Solo la intensidad ultrasónica tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento de las proteínas y los carbohidratos recuperados de biomasa del consorcio S. Se observó que el rendimiento de recuperación de proteínas y carbohidratos disminuye cuando aumenta la intensidad ultrasónica, Tabla 12. El mayor rendimiento de proteína recuperada ( $99 \pm 3\%$ ) se logró a las siguientes condiciones: concentración de biomasa más alta de 75 g/L, energía aplicada más baja de 50 kWh/kg de biomasa seca e intensidad ultrasónica más baja de 0.32 W/mL.

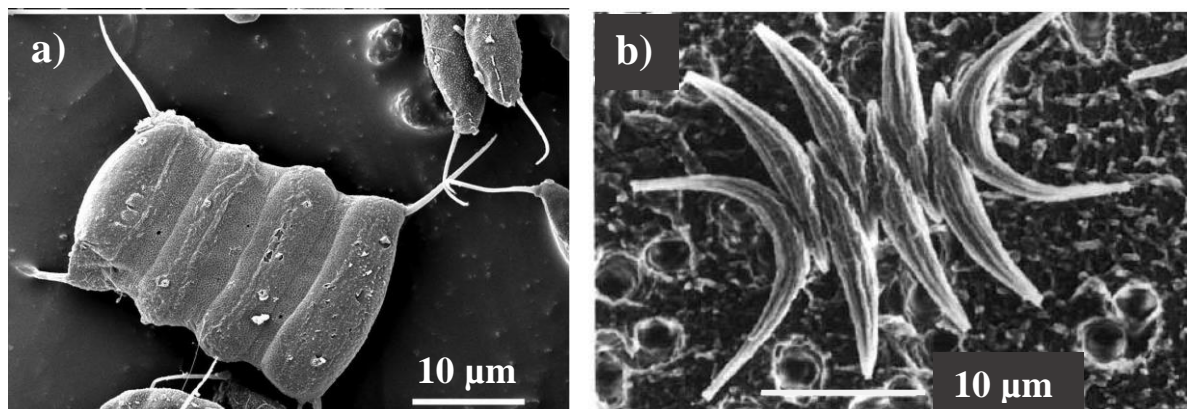


**Figura 21.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) proteínas y b) carbohidratos de biomasa del consorcio S recuperados en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3).

## 5. Resultados y Discusión

El mayor rendimiento de carbohidratos recuperados ( $94 \pm 2\%$ ) se logró a las siguientes condiciones: concentración de biomasa de 50 g/L, energía aplicada de 125 g/L e intensidad ultrasónica más baja de 0.32 W/L, Figuras 21a y 21b.

De la misma forma que para el pretratamiento de biomasa del consorcio D en vista de la alta disrupción celular y el rendimiento de proteínas liberadas en solución (99%) a estas condiciones experimentales, no es necesario llevar a cabo el proceso de extracción, lo que intensifica significativamente el proceso de recuperación de proteínas. El mayor rendimiento de recuperación de proteínas se logró a los mismos parámetros experimentales para ambos tipos de biomasa, esto nos indica que el proceso de pretratamiento propuesto puede llevarse a cabo con otras especies de biomasa esperando resultados similares, al menos para la recuperación de proteínas que es altamente dependiente de la disrupción celular. A diferencia del pretratamiento de biomasa del consorcio D los parámetros estudiados si mostraron un efecto significativo sobre la recuperación de carbohidratos de biomasa del consorcio S. Esto se puede explicar en función de la morfología de las células y estructura que presenta la pared celular de cada tipo de microalga, Figura 22.



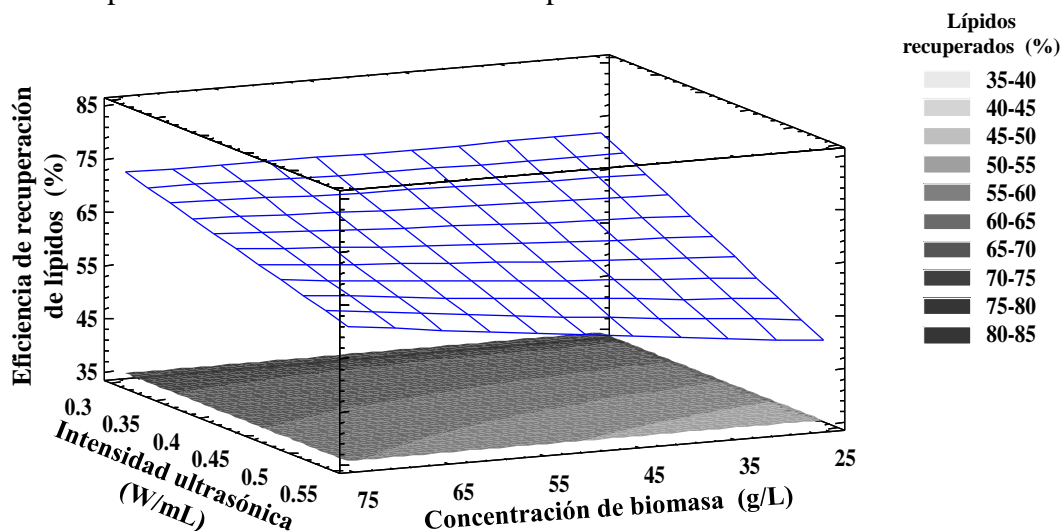
**Figura 22.** Fotomicrografías electrónicas de barrido (MEB) de a) *Desmodesmus sp.* y b) *Scenedesmus obliquus* [243].

Se ha demostrado que el ultrasonido es más eficiente en ciertas especies de microalgas que comparten similitudes en sus características morfológicas, es decir, especies que tienen áreas superficiales grandes como en el caso de *Desmodesmus sp.*, mientras que especies con áreas superficiales más pequeñas como *Scenedesmus obliquus* son resistentes al pretratamiento con ultrasonido. Las microalgas con áreas superficiales grandes son más susceptibles al efecto de las burbujas producidas durante el pretratamiento con ultrasonido. Cuanto más grande es la superficie, más alto es la probabilidad de que la microalga entre en contacto con una burbuja. Este contacto con la microalga provoca la implosión de la burbuja, liberando presión (5000 atm) y temperatura (2000 ° C) localizadas [244].

Ninguno de los parámetros experimentales estudiados mostró un efecto significativo sobre el rendimiento de lípidos recuperados, Tabla 12. El mayor rendimiento de los lípidos recuperados ( $89.81 \pm 1.5\%$ ) se logró a la energía aplicada más alta de 200 kWh/kg de biomasa seca, la concentración de biomasa más baja de 25 g/L y la intensidad ultrasónica más baja de 0.32 W/mL, Figura 23. La influencia de la energía aplicada sobre el rendimiento de los lípidos recuperados podría atribuirse a la disponibilidad de lípidos en las células de microalgas. Los lípidos de microalgas se encuentran dentro de las células como lípidos de almacenamiento (lípidos neutros o no polares) y en la membrana como lípidos estructurales (lípidos polares) [25, 245, 246]. Para llevar a cabo la extracción de los lípidos de almacenamiento es necesario promover la disrupción tanto de la pared celular como de subestructuras intracelulares de las

## 5. Resultados y Discusión

microalgas (citosol y cloroplastos), por lo tanto, la cantidad de energía requerida se incrementa. La extracción de lípidos estructurales solo requiere la ruptura de la matriz de polisacáridos de la pared celular [27]. A pesar de la discrepancia encontrada en el rendimiento de los biocomponentes de biomasa recuperados, la intensidad ultrasónica es el factor experimental que tuvo el impacto más importante en el proceso de pretratamiento. Además, debido a la alta disrupción celular, el pretratamiento logró altos rendimientos de biocomponentes recuperados. Por lo tanto, es posible obtener una combinación de los parámetros experimentales para llevar a cabo la recuperación en tándem de los biocomponentes.



**Figura 23.** Superficie de respuesta del rendimiento de lípidos de biomasa del consorcio S recuperados en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado ( $n=3$ ) para cada conjunto de datos.

### 5.2.2 Efecto del pretratamiento con ozono sobre la disrupción celular y eficiencia de recuperación de biocomponentes

Solo la concentración de biomasa y el tiempo de contacto tuvieron un efecto significativo sobre la eficiencia de componentes liberados de ambos consorcios de biomasa a la fase acuosa, Tabla 13.

**Tabla 13.-** Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de carbohidratos, proteínas y lípidos liberados después del pretratamiento de biomasa de microalgas de los consorcios D y S con ozono ( $n=3$ ).

Origen	Consorcio D			Consorcio S		
	Carbohidratos <sup>a</sup>	Proteínas <sup>b</sup>	Lípidos <sup>c</sup>	Carbohidratos <sup>d</sup>	Proteínas <sup>e</sup>	Lípidos <sup>f</sup>
	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P
Concentración de biomasa (g/L)	<b>0.0114</b>	0.0928	<b>0.0049</b>	<b>0.0044</b>	<b>0.0265</b>	<b>0.0003</b>
Concentración de ozono (mg O <sub>3</sub> /L)	0.7072	0.1062	0.9385	0.9095	0.9663	0.6953
Tiempo de contacto (min)	0.1880	<b>0.0417</b>	0.1473	<b>0.0244</b>	0.4033	0.1998

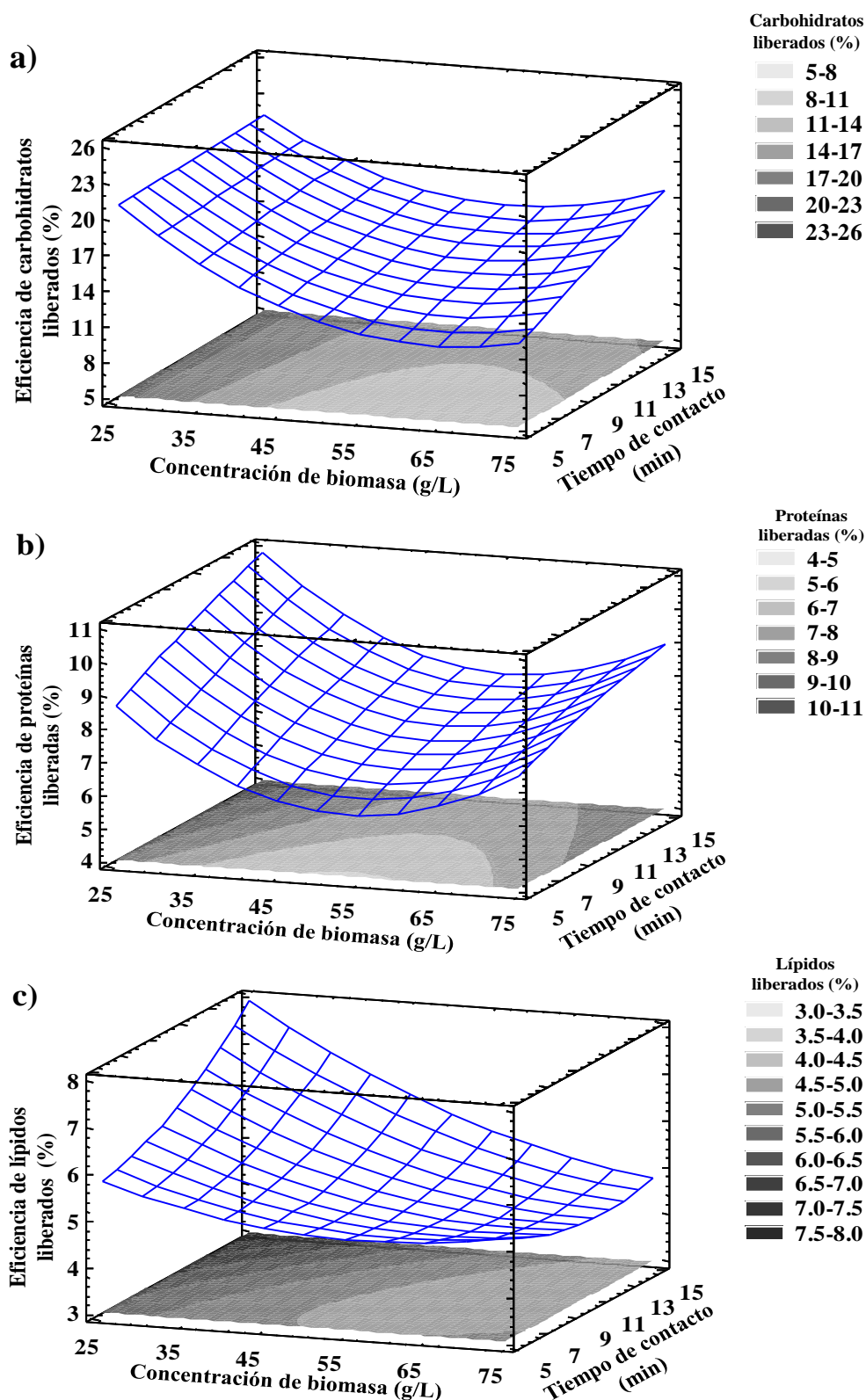
<sup>a</sup> Des Std: 4.74; error abs: 2.92; <sup>b</sup> Des Std: 1.86; error abs: 1.18;

<sup>c</sup> Des Std: 1.23; error abs: 0.78; <sup>d</sup> Des Std: 5.56; error abs: 3.63;

<sup>e</sup> Des Std: 4.00; error abs: 2.70; <sup>f</sup> Des Std: 1.03; error abs: 0.59.

Fuente en negrita denota  $p < 0.05$ .

## 5. Resultados y Discusión

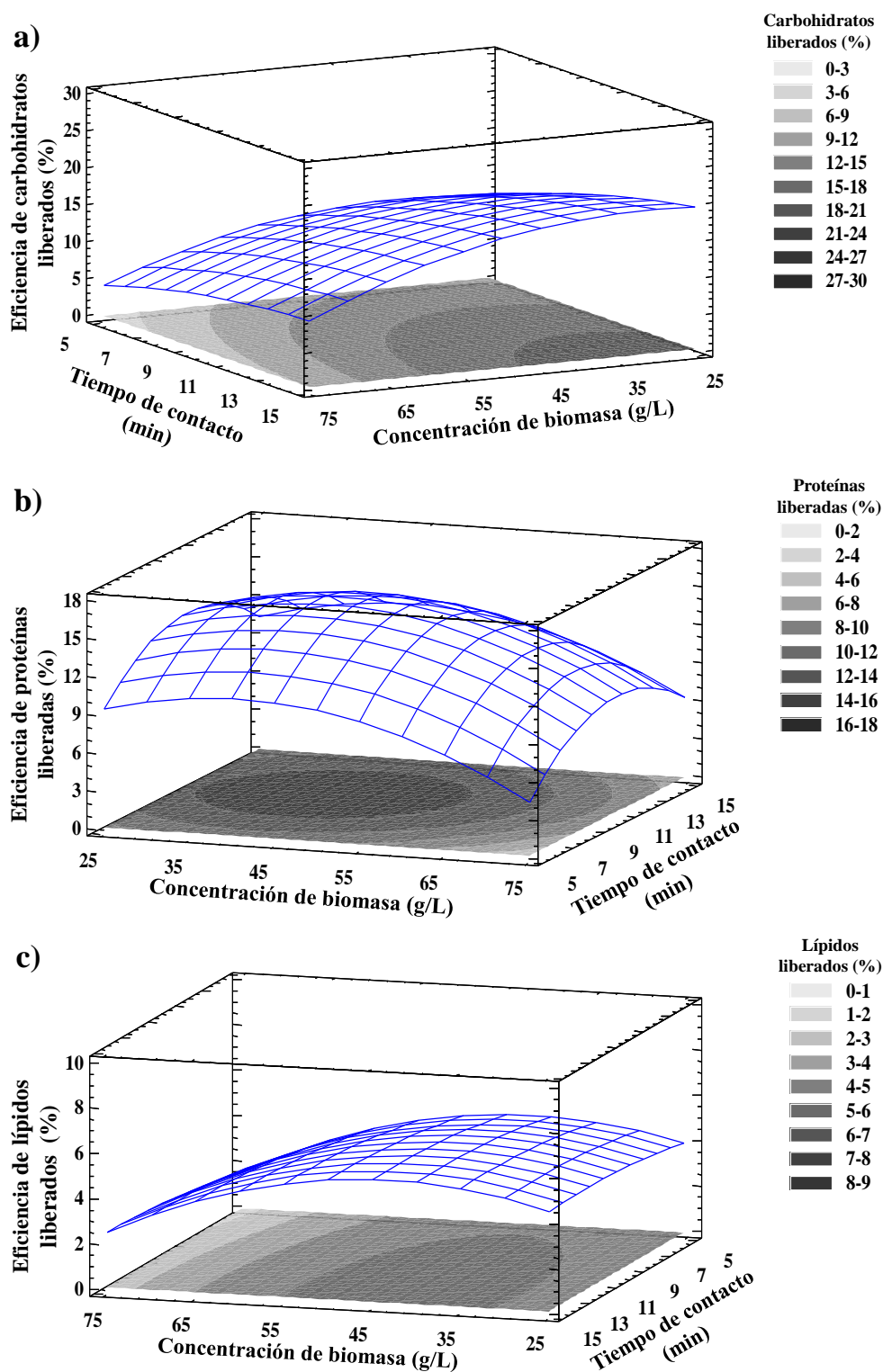


**Figura 24.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) carbohidratos, b) proteínas y c) lípidos de biomasa del consorcio D liberados en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3).

La concentración de biomasa tuvo un impacto negativo sobre el rendimiento de los biocomponentes liberados, ya que un aumento en la concentración de biomasa disminuyó la dosis de ozono. En contraste, un mayor tiempo de contacto tuvo un impacto positivo sobre el rendimiento de los biocomponentes liberados, ya que la dosis de ozono aumenta a medida que

## 5. Resultados y Discusión

aumenta el tiempo de contacto, Figura 24 y Tabla 13. Para el caso de la biomasa del consorcio D los mayores rendimientos de biocomponentes liberados ( $26 \pm 1\%$  de carbohidratos,  $11 \pm 1\%$  de proteínas y  $8 \pm 2\%$  de lípidos) se lograron a un tiempo de contacto más largo de 15 min y la concentración de biomasa más baja de 25 g/L, que representa la dosis de ozono más alta, Figura 24.



**Figura 25.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) carbohidratos, b) proteínas y c) lípidos de biomasa del consorcio S liberados en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado ( $n=3$ ) para cada conjunto de datos.

## 5. Resultados y Discusión

---

Para el caso de biomasa del consorcio S los mayores rendimientos de biocomponentes liberados ( $27 \pm 1\%$  de carbohidratos,  $19 \pm 2\%$  de proteínas y  $8 \pm 0.2\%$  de lípidos) se lograron a la concentración de biomasa de 50 g/L y la concentración más baja de ozono de 3 mg O<sub>3</sub>/L, Figura 25. Durante el proceso de ozonación, la fracción que se liberó en mayor proporción fueron los carbohidratos, seguido de las proteínas y los lípidos para ambos tipos de biomasa. Comparando los rendimientos de proteínas y lípidos liberados (3-19% y 2-8%), el rendimiento de carbohidratos fue mayor (3-26%), Figuras 24a y 25a. Esto es consecuencia del contacto directo entre el ozono y los carbohidratos. Los carbohidratos se almacenan en la capa externa de la pared celular, por lo tanto, el ozono puede romper fácilmente la conexión entre ellos. Esta ruptura promueve la liberación de una fracción de carbohidratos en el medio y produce una fracción de microalgas sólidas, con una pared celular adelgazada con mejor reactividad para procesos posteriores como la extracción de proteínas y lípidos [247].

Los bajos rendimientos de proteínas y lípidos liberados (3-19% y 2-8%) a la solución indicaron una baja disrupción celular, Figuras 24b, 24c, 25b y 25c. Además, el estudio del efecto del ozono sobre la composición de los lípidos recuperados que se presenta en la sección 5.5 indica que los lípidos recuperados eran principalmente lípidos polares que se encuentran en la pared celular de las microalgas. La baja disrupción celular durante el proceso de ozonización podría atribuirse a la resistencia de ambos tipos de biomasa al ataque químico del ozono, que resulta de la construcción de la pared celular [33]. Sin embargo, existe una clara diferencia entre los factores experimentales a los cuales se obtuvieron los mayores rendimientos de biocomponentes liberados para ambos tipos de biomasa.

Mientras que para la biomasa del consorcio D los mayores rendimientos se alcanzan a la dosis de ozono más altas (36-108 mg O<sub>3</sub>/L), para la biomasa del consorcio S los mejores rendimientos se tuvieron a dosis de ozono entre 6-18 mg O<sub>3</sub>/L, lo cual implica una disminución considerable de la demanda de ozono. Esto se debe principalmente a las diferencias que existen en la estructura de la pared celular de cada especie. Las especies de *Desmodesmus sp.* y *Scenedesmus obliquus*, que son las que se encuentran en mayor proporción en ambos consorcios de biomasa, están claramente diferenciadas por sus características de la pared celular. Las células de *Desmodesmus* son células con cuatro capas de pared de esporopolenina con peculiares ornamentos submicroscópicos en la capa exterior. La esporopolenina es un polímero alifático que forma enlaces cruzados entre compuestos alifáticos de cadena lineal, grupos fenólicos y aromáticos. Por lo tanto, los enlaces dobles que podrían ser atacados por el ozono están menos disponibles. Adicionalmente, la mayoría de las especies de *Desmodesmus* tienen una o varias espinas o "dientes" en cada célula, mientras que estas estructuras están ausentes en *Scenedesmus*. Las células de *Scenedesmus obliquus* exhiben una característica estructura trilaminar resistente al tratamiento químico [248]. Las paredes celulares de *Scenedesmus obliquus* contienen celulosa en las capas de la pared interna y algaenanos en la capa trilaminar que las vuelven insolubles, resistentes a la acetólisis y contribuyen a la rigidez [249]. Aunque la estructura de la pared celular de las microalgas es lo que claramente las diferencia también se presentan otras características morfológicas que pueden influir en el efecto del pretratamiento tales como las estructuras de la superficie de la pared celular o la forma de la célula [243].

La influencia directa de las condiciones de pretratamiento en el rendimiento de los biocomponentes recuperados después del pretratamiento con ozono fue diversa para ambos tipos de biomasa en contraste con la influencia mostrada en el rendimiento de los biocomponentes liberados. Para el caso de pretratamiento de biomasa del consorcio D los resultados se muestran en la Tabla 14. Los parámetros estudiados no mostraron un impacto significativo sobre el rendimiento de los carbohidratos recuperados, Tabla 14. Como se

## 5. Resultados y Discusión

mencionó anteriormente, el pretratamiento con ozono induce la liberación de carbohidratos en la solución y facilita su extracción debido a su despolimerización.

El mayor rendimiento de carbohidratos recuperados ( $89 \pm 0.4\%$ ) se logró con la concentración de biomasa más alta de 75 g/L, el tiempo de contacto más largo de 15 min y la dosis de ozono más baja de 3 mg O<sub>3</sub>/L, Figura 26a. La concentración de ozono tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento de las proteínas recuperadas, donde el aumento de la concentración de ozono aumentó el rendimiento de las proteínas recuperadas. No obstante, la concentración de biomasa tuvo un efecto negativo, el aumento de la concentración de biomasa disminuyó el rendimiento de las proteínas recuperadas, Tabla 14.

**Tabla 14.-** Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de carbohidratos, proteínas y lípidos recuperado después del pretratamiento del consorcio D con ozono (n=3).

Fuente	Carbohidratos <sup>a</sup>	Proteínas <sup>b</sup>	Lípidos <sup>c</sup>
	Valor P	Valor P	Valor P
Concentración de biomasa (g/L)	0.9626	<b>0.0001</b>	<b>0.0021</b>
Concentración de ozono (mg O <sub>3</sub> /L )	0.9895	<b>0.0341</b>	0.6652
Intensidad ultrasónica (W/mL)	0.5379	0.2270	<b>0.0152</b>

<sup>a</sup> Des Std: 10.21; error abs.: 6.38; <sup>b</sup> Des Std: 5.68; error abs.: 3.76;

<sup>c</sup> Des Std: 9.10; error abs.: 5.09; Fuente en negrita denota  $p < 0.05$ .

El mayor rendimiento de proteínas recuperadas ( $43 \pm 5\%$ ) se logró con la concentración de ozono más alta de 9 mg O<sub>3</sub>/L y la concentración de biomasa más baja de 25 g/L, que representan las dosis de ozono más altas, Figura 26b. El objetivo principal alcanzado por el pretratamiento con ozono es el adelgazamiento de la pared celular, debido a la despolimerización de la matriz de polisacárido. Por lo tanto, la dosis de ozono tiene un impacto importante sobre el rendimiento de las proteínas recuperadas. Tanto el aumento de la concentración de ozono como la disminución de la concentración de biomasa inducen un aumento en la dosis de ozono. Un aumento en la dosis de ozono puede promover el adelgazamiento de la pared celular, mejorando el proceso de extracción de proteínas.

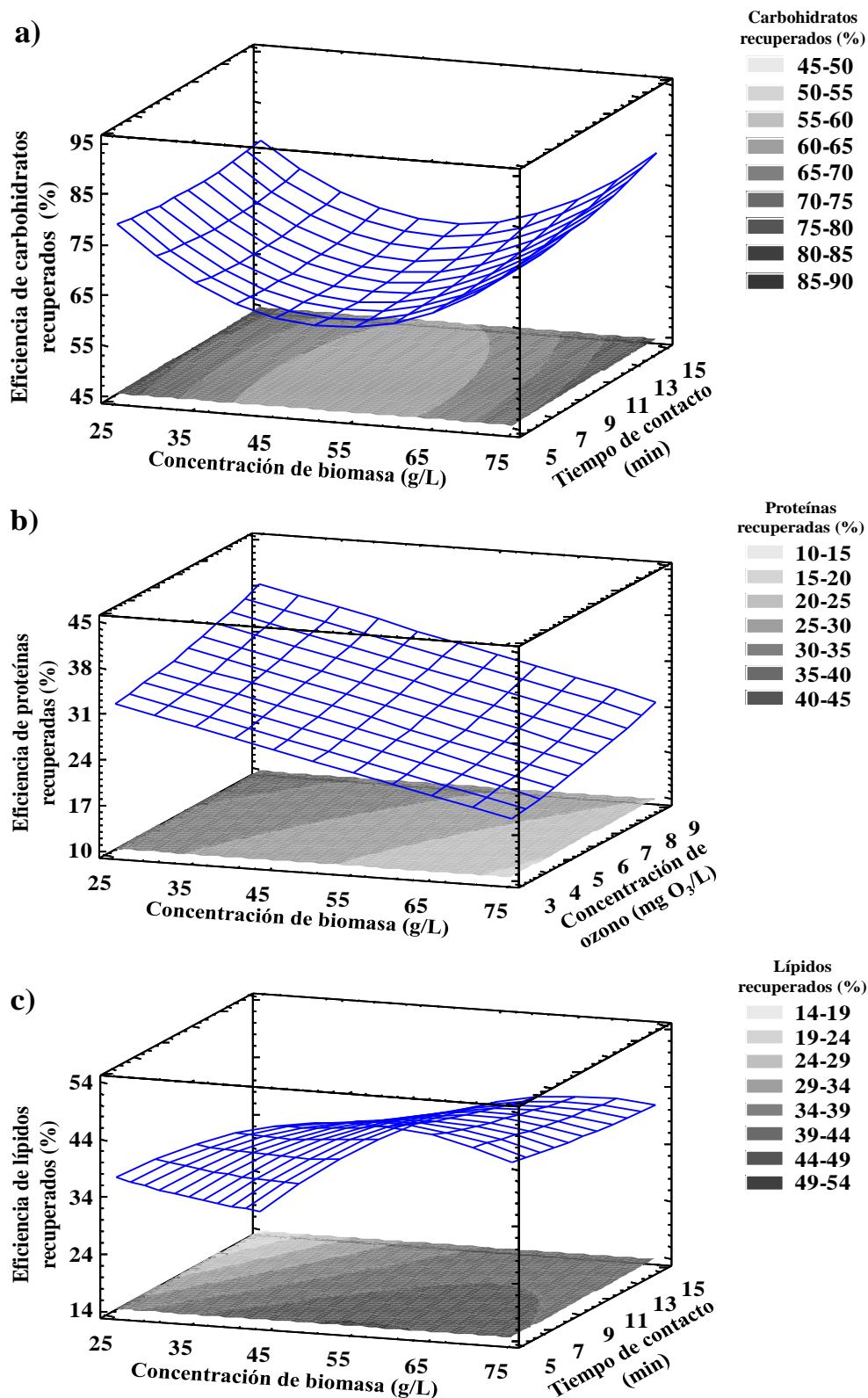
La concentración de biomasa tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento de los lípidos recuperados, donde al aumentar de la concentración de biomasa aumenta el rendimiento de los lípidos recuperados. En contraste, el tiempo de contacto tuvo un efecto negativo. Un aumento en el tiempo de contacto disminuyó el rendimiento de los lípidos recuperados, Tabla 14. La concentración de biomasa tuvo un efecto positivo debido a la disminución de la dosis de ozono a medida que aumenta la concentración de biomasa. Debido a la ubicación y estructura, los ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles a la oxidación, por lo tanto, la reducción de la dosis de ozono evita la oxidación de los lípidos de la pared celular (por ozono). Resultados similares fueron reportados por Valeriano González y colaboradores [222] ellos descubrieron que la recuperación de lípidos disminuyó con un aumento en la dosis de ozono durante el proceso de flotación con ozono de las microalgas. Sin embargo, durante su proceso fueron aplicadas dosis de ozono mucho mayores (280-1360 mg de O<sub>3</sub>/g de biomasa).

Del mismo modo, el tiempo de contacto tuvo un efecto negativo en el rendimiento de los lípidos recuperados, debido a su degradación por el ozono. El fuerte efecto oxidante del ozono y la alta reactividad de los lípidos con agentes oxidantes fuertes promueve la degradación de los lípidos [222]. El proceso de ozonización tiene lugar en los carbonos adyacentes a los dobles enlaces de



## 5. Resultados y Discusión

los ácidos grasos poliinsaturados, debido a los radicales formados y la presencia de doble enlace puede estabilizarse por su resonancia [3, 250].



**Figura 26.** Superficie de respuesta del rendimiento de (a) carbohidratos, (b) proteínas y (c) lípidos de biomasa del consorcio D recuperados en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado ( $n=3$ ) para cada conjunto de datos.

## 5. Resultados y Discusión

El mayor rendimiento de los lípidos recuperados ( $54 \pm 3\%$ ) se logró con la concentración de suspensión de 50 g/L y el tiempo de contacto más corto de 5 min, Figura 26c. La disrupción celular incompleta hizo que el proceso de extracción con solvente para la recuperación de lípidos fuera ineficiente. Cuando la alteración de las células de microalgas no se produce correctamente, la pared celular evita el contacto entre los lípidos y el solvente, por lo que el solvente no tiene acceso a los lípidos almacenados dentro de la célula, lo que disminuye el rendimiento de los lípidos recuperados y extiende el tiempo de proceso [251]. Por lo tanto, los lípidos recuperados por el pretratamiento con ozono fueron principalmente lípidos estructurales (ácidos grasos poliinsaturados), que se encuentran en la pared celular de las microalgas [239]. Esta propuesta puede ser respaldada por el análisis de composición de los lípidos recuperados, como se muestra en la sección 5.2.5.

Para el caso del pretratamiento de biomasa del consorcio S solo la concentración de biomasa mostró un efecto significativo en el rendimiento de los carbohidratos recuperados, Tabla 15.

**Tabla 15.-** Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de carbohidratos, proteínas y lípidos recuperado después del pretratamiento del consorcio S con ozono (n=3).

Fuente	Carbohidratos <sup>a</sup>	Proteínas <sup>b</sup>	Lípidos <sup>c</sup>
	Valor P	Valor P	Valor P
Concentración de biomasa (g/L)	<b>0.0050</b>	<b>0.0286</b>	0.4219
Concentración de ozono (mg O <sub>3</sub> /L)	0.3243	0.1780	0.0638
Intensidad ultrasónica (W/mL)	0.2046	0.3653	0.4082

<sup>a</sup> Des Std: 16.27; error abs.: 10.31; <sup>b</sup> Des Std: 9.50; error abs.: 6.15;

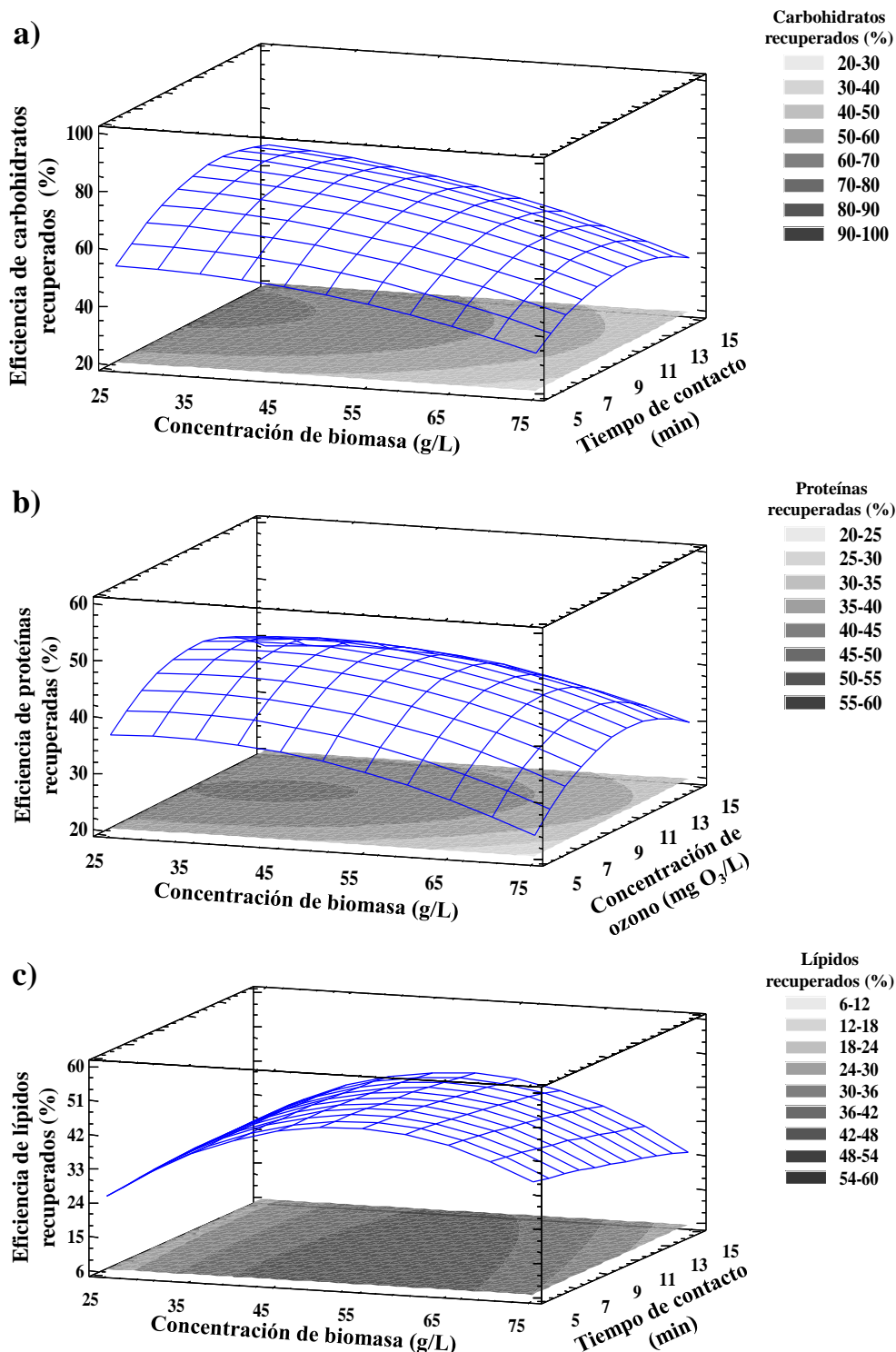
<sup>c</sup> Des Std: 10.46; error abs.: 7.23; Fuente en negrita denota  $p < 0.05$ .

El mayor rendimiento de carbohidratos recuperados ( $92 \pm 2\%$ ) se logró a la concentración de biomasa de 50 g/L, el tiempo de contacto de 10 min y la concentración de ozono de 6 mg O<sub>3</sub>/L (Figura 27a). La concentración de biomasa tuvo un efecto negativo en el rendimiento de las proteínas recuperadas, el aumento de la concentración de biomasa disminuyó el rendimiento de las proteínas recuperadas, Tabla 15. El mayor rendimiento de proteínas recuperadas ( $56 \pm 4\%$ ) se logró con la concentración de ozono de 6 mg O<sub>3</sub>/L, la concentración de biomasa de 50 g/L y el tiempo de contacto de 10 min, Figura 27b. Los parámetros estudiados no mostraron un efecto significativo en el rendimiento de recuperación de lípidos, Tabla 15. El mayor rendimiento de lípidos recuperados ( $59 \pm 0.5\%$ ) se obtuvo a la concentración de biomasa de 50 g/L, la concentración de ozono de 9 mg O<sub>3</sub>/L y el tiempo de contacto de 10 min, Figura 27c.

Los resultados de eficiencia de recuperación de biocomponentes de biomasa del consorcio S muestran una tendencia similar a la de los resultados obtenidos para el pretratamiento de la biomasa del consorcio D. El componente que se recupera en mayor proporción son los carbohidratos, seguido de proteínas y lípidos que se recuperan en porcentajes similares de alrededor de 50%. Esto se debe principalmente a la disposición de los biocomponentes en la biomasa y a que con el pretratamiento con ozono no se llega a la disrupción celular. Como se mencionó anteriormente, las proteínas y lípidos muestran menores eficiencias de recuperación debido a que son materiales intracelulares. Sin embargo, para el pretratamiento de biomasa del consorcio S se obtuvieron eficiencias de recuperación de biocomponentes ligeramente mayores (del orden del 10% para proteínas y lípidos) que para la recuperación de biocomponentes de biomasa del consorcio D. Esto se atribuye principalmente a que las células de *Desmodesmus sp.* presentan paredes celulares más gruesas que las células de *Scenedesmus obliquus* como se

## 5. Resultados y Discusión

discutió anteriormente. Otro factor importante que impide la recuperación de lípidos además de la poca eficiencia de disrupción, es que el reproceso de extracción se lleva a cabo con biomasa húmeda. Lo cual puede incrementar considerablemente la intensificación del proceso de extracción, pero al mismo tiempo ejerce una barrera importante para que el proceso se pueda llevar a cabo con mayor eficiencia.

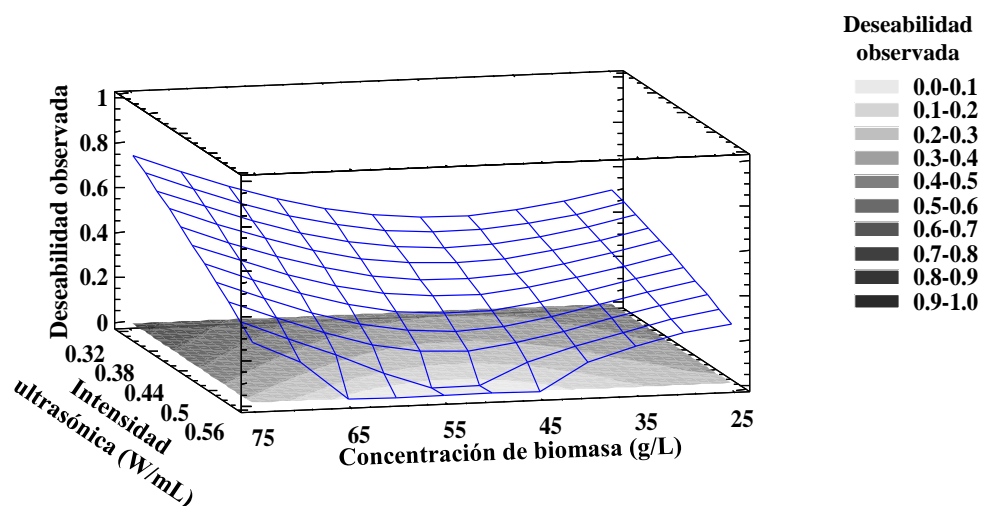


**Figura 27.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) carbohidratos, b) proteínas y c) lípidos de biomasa del consorcio S recuperados en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado ( $n=3$ ) para cada conjunto de datos.

5.2.3 Función de deseabilidad para la recuperación en tándem de biocomponentes microalgales

La función de deseabilidad se ha aplicado en gran medida en procesos industriales que implican múltiples respuestas. En este método, cada conjunto de respuestas obtenidas mediante la aplicación de un diseño experimental se transforma en valores adimensionales llamados deseabilidades individuales, que luego se agregan en una sola respuesta llamada deseabilidad general. Al ajustar un modelo matemático a los valores de deseabilidad para describir adecuadamente su comportamiento, es posible optimizar las variables en estudio considerando todas las respuestas disponibles. El primer paso en la aplicación de este método es el cálculo de las deseabilidades individuales para cada valor que conforma el conjunto de respuestas obtenido para una propiedad medida específica. Los valores de deseabilidad pueden variar dentro de una escala de 0 (respuesta no deseada) a 1 (respuesta completamente deseable). Los valores intermedios de deseabilidad indican respuestas más o menos deseables, dependiendo de su aproximación al valor unitario. La obtención de esta escala es esencial, una vez que hace posible combinar las diversas respuestas de diferentes órdenes de magnitud en una sola respuesta, sin correr el riesgo de superponer el efecto de otra [252].

En este estudio se aplicó la función de deseabilidad para obtener una combinación de los parámetros experimentales que proporcionan un buen resultado para los rendimientos de recuperación de lípidos, proteínas y carbohidratos para cada pretratamiento y tipo de biomasa. Se especificó el valor objetivo o el rango aceptable para cada respuesta. Para el pretratamiento con ultrasonido de biomasa del consorcio D la eficiencia máxima para los valores estudiados se logró a una concentración de suspensión de 75 g/L, energía aplicada de 50 kWh/kg de biomasa seca e intensidad ultrasónica de 0.32 W/mL. Los rendimientos de proteínas, carbohidratos y lípidos recuperados en estas condiciones experimentales fueron  $97 \pm 0.5\%$ ,  $89 \pm 3\%$  y  $73 \pm 1\%$ , respectivamente. La deseabilidad observada de este experimento fue de 0.92, Figura 28. Para la recuperación de lípidos y carbohidratos se necesitó un pretratamiento con ultrasonido y un proceso de extracción adicional, mientras que para la recuperación de proteínas solo fue necesario el pretratamiento con ultrasonido.

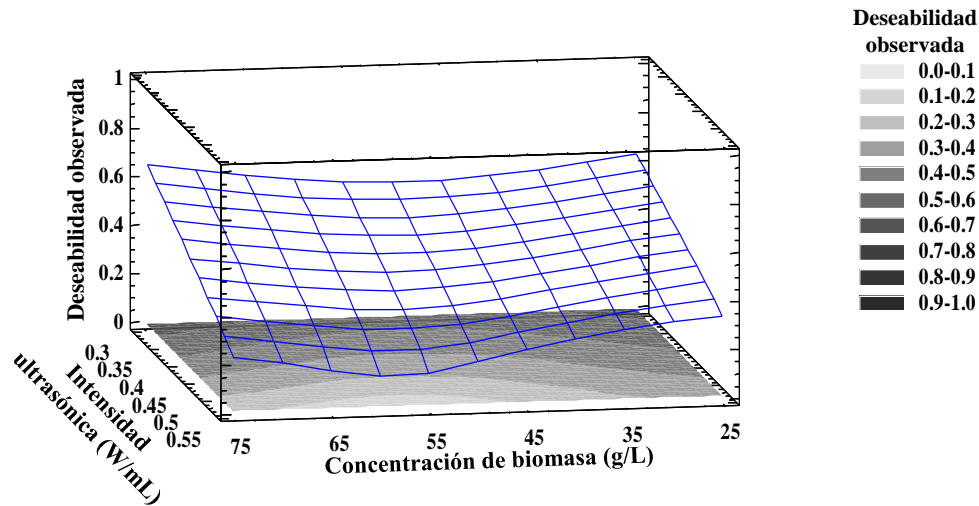


**Figura 28.** Superficie de respuesta para la deseabilidad observada del proceso de pretratamiento de biomasa del consorcio D con ultrasonido en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa.

Para el pretratamiento con ultrasonido de biomasa del consorcio S, la eficiencia máxima para los valores estudiados se logró a una concentración de suspensión de 25 g/L, energía aplicada de 200 kWh/kg de biomasa seca e intensidad ultrasónica de 0.32 W/mL. Los rendimientos de

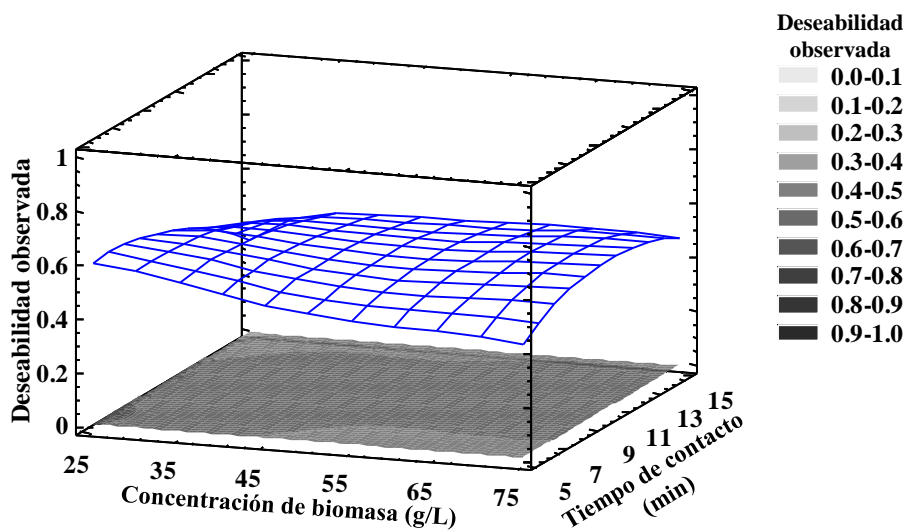
## 5. Resultados y Discusión

proteínas, carbohidratos y lípidos recuperados a estas condiciones experimentales fueron  $83 \pm 7\%$ ,  $77 \pm 2\%$  y  $90 \pm 2\%$ , respectivamente. La deseabilidad observada de este experimento fue de 0.74, Figura 29. De igual forma que para la recuperación de biocomponentes del consorcio D, para la recuperación de lípidos y carbohidratos de biomasa del consorcio S se necesitó un pretratamiento con ultrasonido y un proceso de extracción adicional, mientras que para la recuperación de proteínas solo fue necesario el pretratamiento con ultrasonido.



**Figura 29.** Superficie de respuesta para la deseabilidad observada del proceso de pretratamiento de biomasa del consorcio S con ultrasonido en función de la intensidad ultrasónica y la concentración de biomasa.

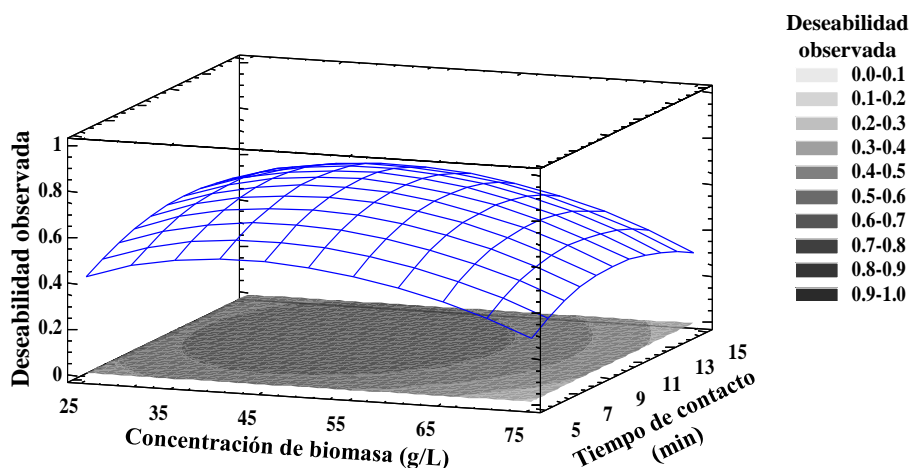
Para el pretratamiento con ozono de biomasa del consorcio D la concentración de ozono de 9 mg  $O_3/L$ , concentración de biomasa de 25 g/L y tiempo de contacto de 5 min fueron los parámetros experimentales a los que se logró la máxima eficiencia de recuperación para los valores estudiados. A estas condiciones experimentales se alcanzaron rendimientos máximos de carbohidratos recuperados de  $85 \pm 2\%$ , lípidos de  $48 \pm 1\%$  y proteínas de  $25 \pm 1\%$ . La deseabilidad observada de este experimento fue de 0.59, Figura 30. Para la recuperación de todos los biocomponentes fue necesario el pretratamiento con ozono y un proceso de extracción adicional.



**Figura 30.** Superficie de respuesta para la deseabilidad observada del proceso de pretratamiento de biomasa del consorcio D con ozono en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa.

## 5. Resultados y Discusión

Para el pretratamiento con ozono de biomasa del consorcio S la concentración de ozono de 6 mg O<sub>3</sub>/L, concentración de biomasa de 50 g/L y tiempo de contacto de 10 min fueron los parámetros experimentales a los que se logró la máxima eficiencia de recuperación para los valores estudiados. A estas condiciones experimentales se alcanzaron rendimientos máximos de carbohidratos recuperados de 92 ± 2%, lípidos de 37 ± 5% y proteínas de 56 ± 4%. La deseabilidad observada de este experimento fue de 0.82, Figura 31. Para la recuperación de todos los biocomponentes fue necesario el pretratamiento con ozono y un proceso de extracción adicional.



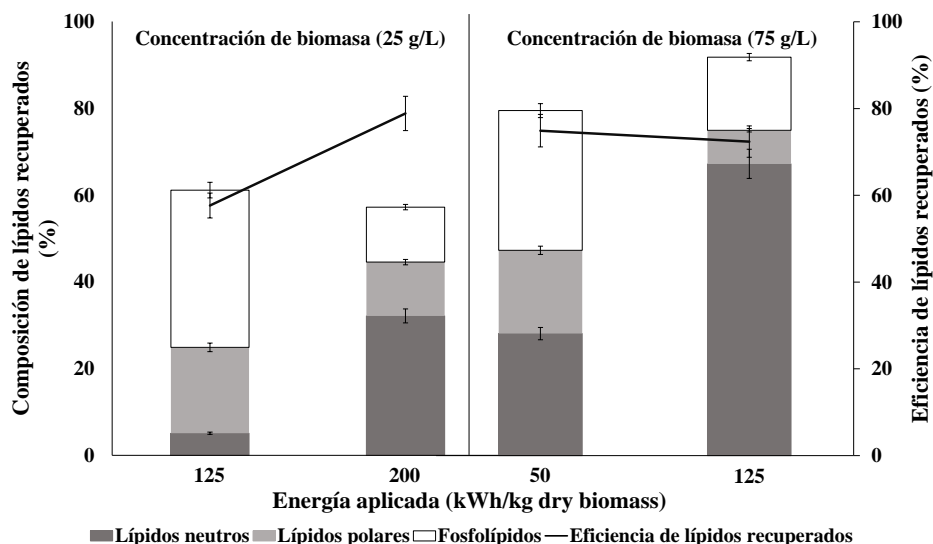
**Figura 31.** Superficie de respuesta para la deseabilidad observada del proceso de pretratamiento de biomasa del consorcio S con ozono en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa.

El pretratamiento con ozono no logró una alta disrupción celular para la recuperación en tándem de los biocomponentes a las condiciones experimentales trabajadas en este estudio. Sin embargo, la ozonación fue un proceso de pretratamiento ideal para llevar a cabo la liberación y despolimerización de carbohidratos de microalgas. La solución de carbohidratos obtenida después del pretratamiento con ozono es atractiva para la producción de biocombustibles, ya que los carbohidratos de microalgas como la celulosa y las hemicelulosas deben descomponerse en azúcares monoméricos (azúcares fermentables) antes de convertirse en biocombustibles [253, 254]. Además, el pretratamiento de la biomasa de microalgas con ozono es atractivo para la producción de metano, ya que puede facilitar la hidrólisis de la porción recalcitrante de carbohidratos y, por lo tanto, aumentar el rendimiento de metano [255]. La ozonación es un proceso útil de pretratamiento y su efecto en diferentes especies de microalgas que presentan propiedades similares de biorremediación debe examinarse para aumentar la eficiencia del pretratamiento.

### 5.2.4 Efecto del pretratamiento en la composición de los lípidos recuperados

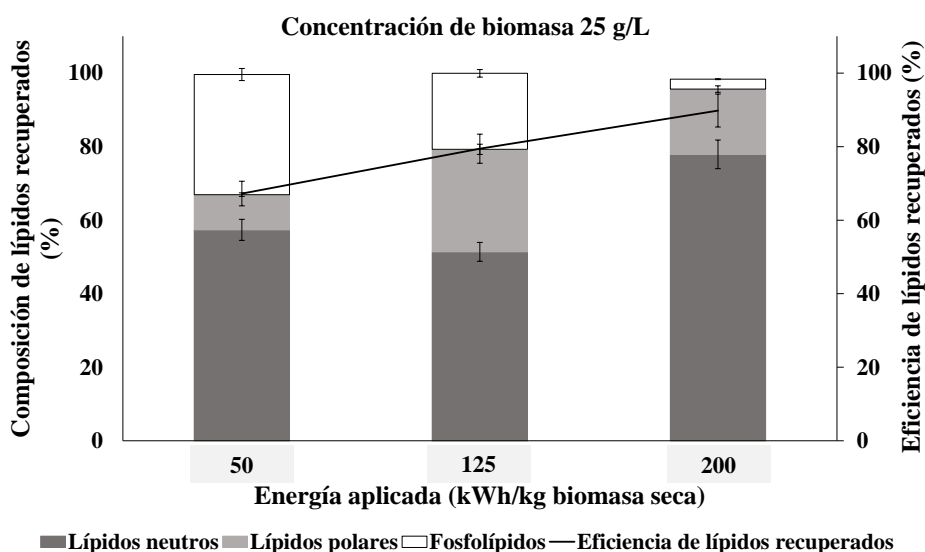
El efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono sobre la calidad de los lípidos recuperados fue función del aumento en el porcentaje del total de lípidos recuperados que se pueden convertir a FAME. Esto significa un aumento en la fracción de lípidos neutros. Para el pretratamiento con ultrasonido de biomasa de microalgas del consorcio D se estudió el efecto de la concentración de la suspensión y la energía aplicada, Figura 32.

## 5. Resultados y Discusión



**Figura 32.** Gráfico del efecto del pretratamiento con ultrasonido en la composición de los lípidos recuperados de biomasa del consorcio D en función de la energía aplicada y la concentración de biomasa.

La energía aplicada tuvo un efecto positivo en la calidad de los lípidos recuperados, después del pretratamiento con ultrasonido. El rendimiento de lípidos neutros aumentó de 5% a 32% a una concentración de suspensión de 25 g/L, y de 28% a 67% a una concentración de suspensión de 75 g/L. Sin embargo, la concentración de la suspensión tuvo el efecto más significativo sobre la composición de los lípidos recuperados. El rendimiento de los lípidos neutros incrementó del 5% al 67% cuando la concentración de la suspensión aumentó de 25 a 75 g/L a una energía aplicada de 125 kWh/kg de biomasa seca. Simultáneamente, la fracción de lípidos y fosfolípidos polares disminuyó del 20% al 8% y del 36% al 17%, respectivamente. Este efecto puede atribuirse al aumento de la eficiencia de ruptura celular, lo que mejoró la extracción de los lípidos de almacenamiento. Asimismo, el rendimiento de extracción de los lípidos neutros puede aumentar debido a la oxidación de los fosfolípidos y los lípidos polares por los radicales libres ( $H\cdot$ ,  $HO\cdot$  y  $HOO\cdot$ ) formados por la termólisis del agua durante el proceso de ultrasonido.



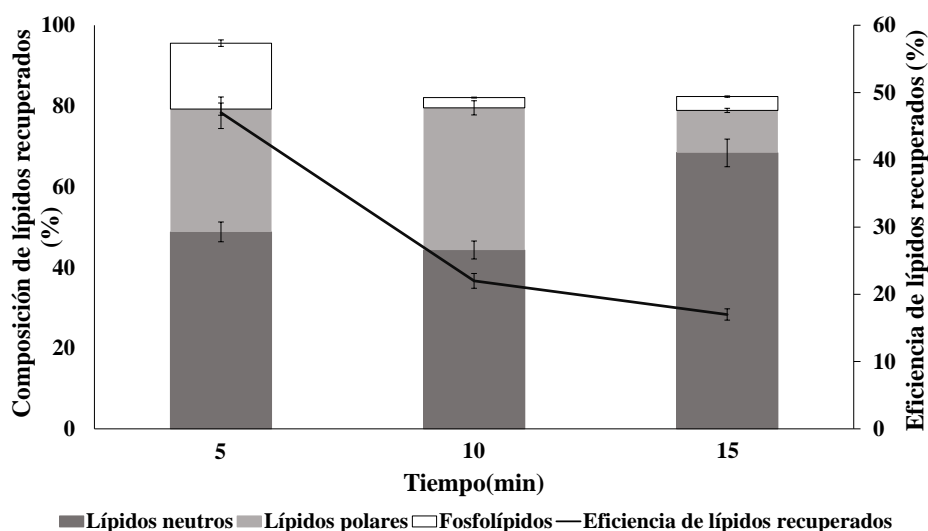
**Figura 33.** Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la composición de los lípidos recuperados de biomasa del consorcio S en función de la energía aplicada.

## 5. Resultados y Discusión

Para el pretratamiento con ultrasonido de biomasa de microalgas del consorcio S se estudió el efecto de la concentración de la energía aplicada a una concentración de biomasa de 25 g/L e intensidad ultrasónica de 0.32 W/L. Estas fueron las condiciones a las cuales se obtuvieron mejores resultados, Figura 33.

La energía aplicada tuvo un efecto significativamente positivo en la calidad de los lípidos recuperados después del pretratamiento con ultrasonido. El rendimiento de lípidos neutros incremento de 57% a 78% cuando la energía aplicada aumentó de 50 a 200 kWh/kg de biomasa seca. Simultáneamente, el porcentaje de fosfolípidos disminuyó considerablemente de 33% a 3% y el rendimiento de lípidos recuperados aumentó de 67% a 90%. Por lo tanto, el pretratamiento de biomasa del consorcio S con ultrasonido no solo incrementó la eficiencia de extracción, sino que también aumentó la calidad de los lípidos recuperados, útiles para aplicaciones como la producción de biodiesel.

La influencia del tiempo de contacto sobre la composición de los lípidos recuperados de biomasa del consorcio D tuvo un efecto positivo, Figura 34.



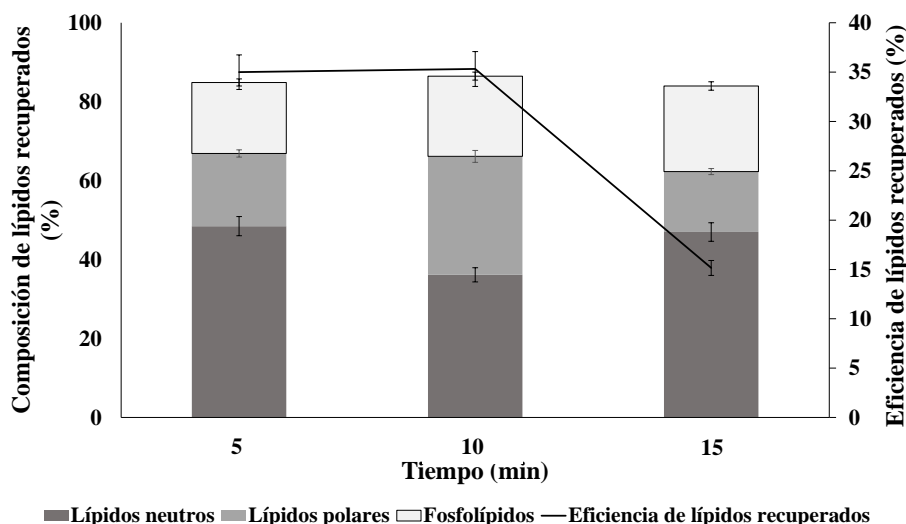
**Figura 34.** Efecto del pretratamiento con ozono en la composición de los lípidos recuperados de biomasa del consorcio D en función del tiempo de contacto.

La cantidad de lípidos neutros incrementó de 49% a 63% cuando el tiempo de contacto aumentó de 5 a 15 min a una concentración de suspensión de 25 g/L. Simultáneamente, el rendimiento de lípidos y fosfolípidos polares se redujo de 30% a 10% y de 16% a 3%, respectivamente. Sin embargo, a las mismas condiciones experimentales, el rendimiento de los lípidos recuperados disminuyó considerablemente de 47% a 17%, como consecuencia de la degradación de los lípidos polares y fosfolípidos, debido a un fuerte efecto oxidante del ozono. El método utilizado para la extracción de lípidos también puede tener un efecto, pero aquí se mantuvo constante.

La influencia del tiempo de contacto sobre la composición de los lípidos recuperados de biomasa del consorcio S no mostro ningún efecto, Figura 35. La cantidad de lípidos neutros se mantuvo prácticamente constante, ya que pasa de 48.5% a 47% cuando el tiempo de contacto aumentó de 5 a 15 min a una concentración de suspensión de 75 g/L. Simultáneamente, el rendimiento de lípidos y fosfolípidos también se mantuvieron constantes de 18% al 15% y del 18% a 22%, respectivamente. A las mismas condiciones experimentales, el rendimiento de los lípidos recuperados disminuyó considerablemente de 35% a 15% como consecuencia de la degradación de los lípidos, debido a un fuerte efecto oxidante del ozono.



## 5. Resultados y Discusión



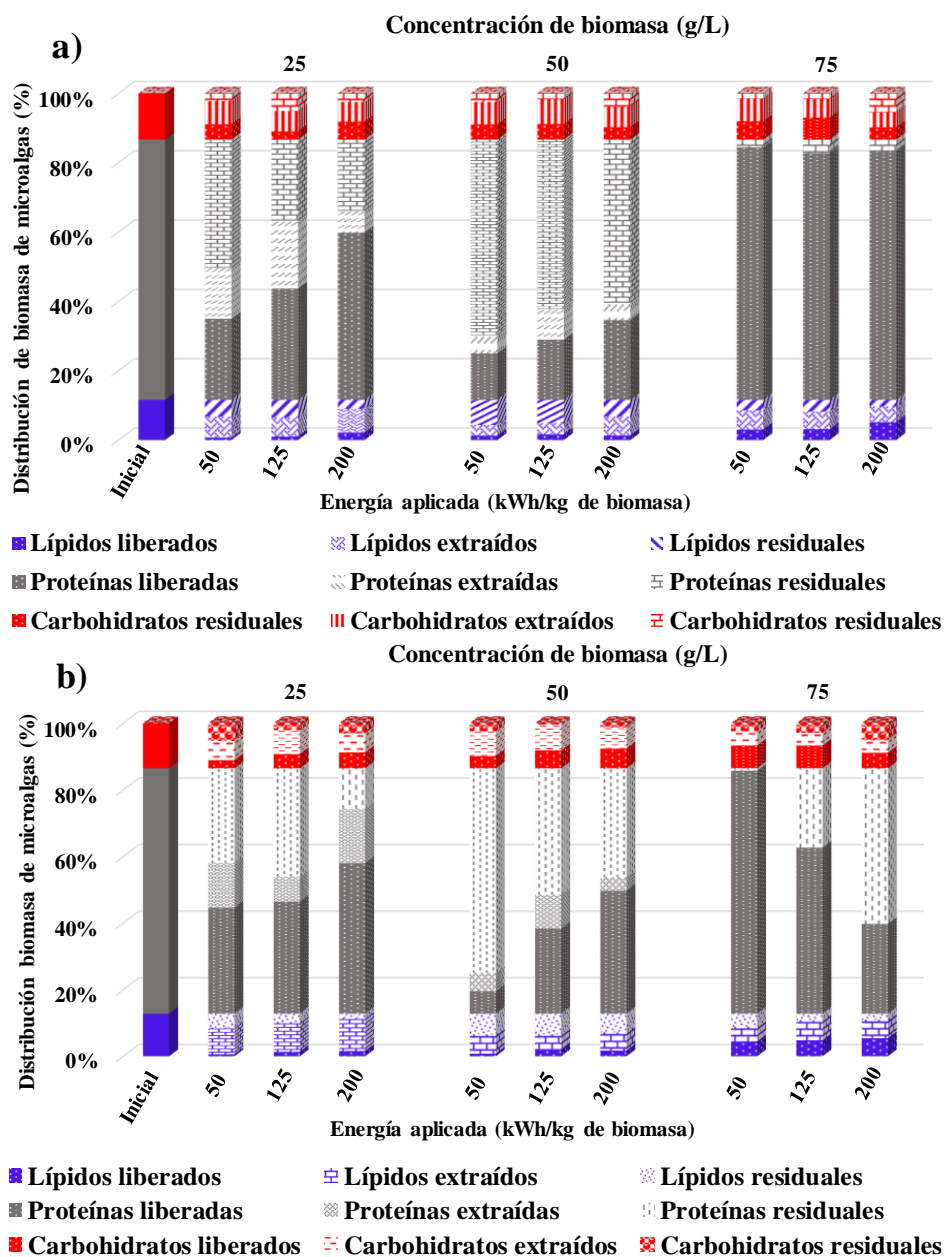
**Figura 35.** Efecto del pretratamiento con ozono en la composición de los lípidos recuperados de biomasa del consorcio S en función del tiempo de contacto.

### 5.2.5 Balance de masa

En la Figura 36 se presenta el balance de masa para el pretratamiento con ultrasonido de biomasa de ambos tipos de biomasa a la intensidad ultrasónica de 0.32 W/mL. Para ambos tipos de biomasa, la distribución de biomasa de microalgas fue función del proceso de pretratamiento con ultrasonido. La fracción de biocomponentes liberados a la fase acuosa aumenta a medida que aumenta la concentración de biomasa y la energía aplicada. Sin embargo, a la concentración de biomasa más alta (75 g/L) la fracción de proteínas y carbohidratos residuales aumenta a medida que aumenta la energía aplicada. Este efecto se atribuye a la degradación de los biocomponentes, ya que la fracción de proteínas y carbohidratos liberados a la fase acuosa aumentó considerablemente, debido a la disrupción celular. Por lo tanto, están expuestos a los radicales formados durante el proceso de ultrasonido durante mucho tiempo.

En el caso de biomasa del consorcio D la fracción de carbohidratos residuales fue la que incrementó en mayor medida, Figura 36a. En el caso de la biomasa del consorcio S, la fracción de proteínas residuales es la que aumenta de forma más significativa, debido a que la pared celular de *Desmodesmus sp.* es más rígida que la de *Scenedesmus obliquus*, Figura 36b.

## 5. Resultados y Discusión



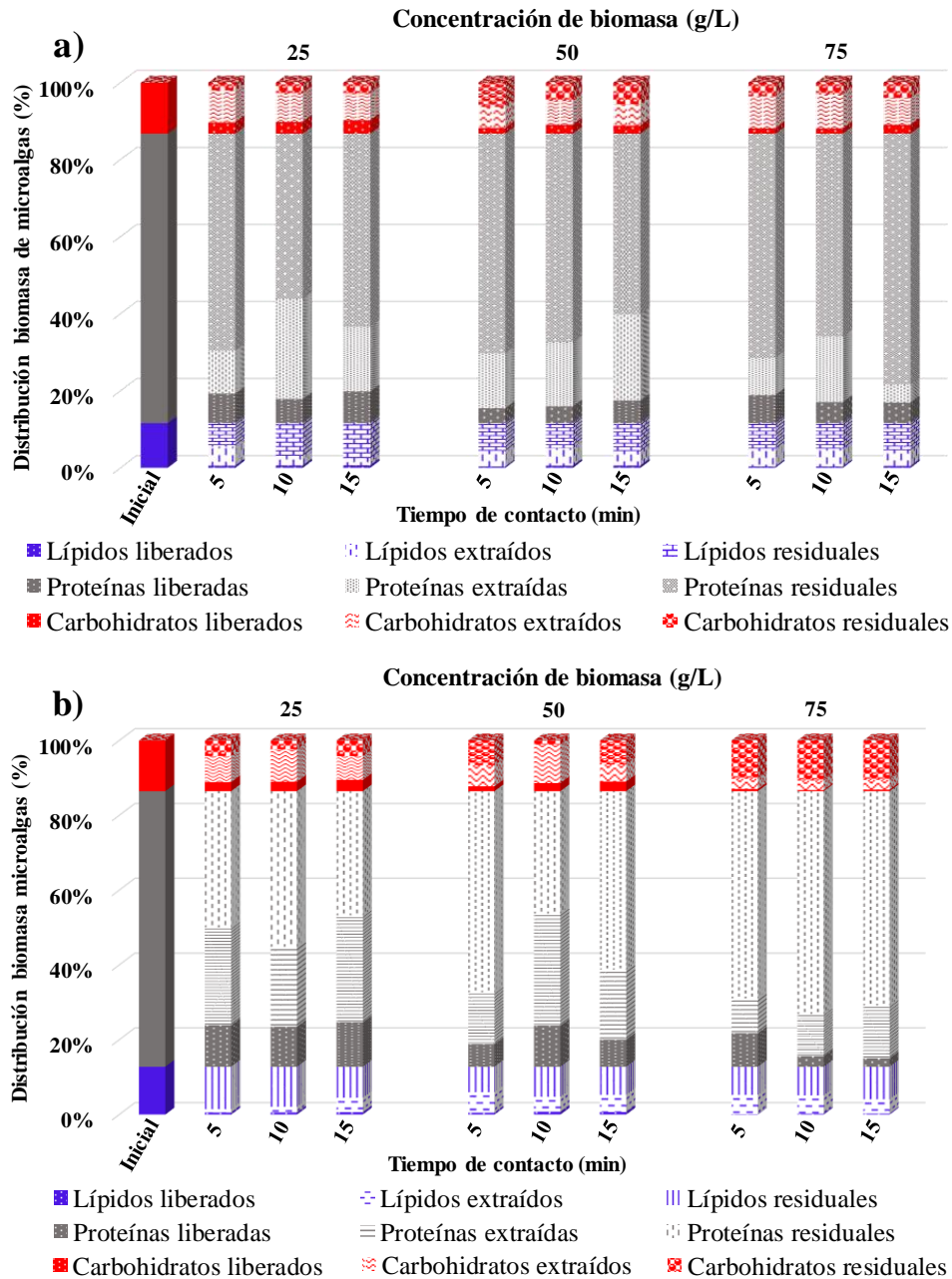
**Figura 36.** Balance de masa para el pretratamiento con ultrasonido de a) consorcio D y b) consorcio S a una intensidad ultrasónica de 0.32 W/mL en función de la energía aplicada y concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos.

Para el pretratamiento con ozono, la fracción de biocomponentes residuales incrementó considerablemente a medida que aumentó la concentración de biomasa. Este efecto se atribuye a la baja disrupción celular. Por lo tanto, la fracción de los biocomponentes permaneció en las células de microalgas a medida que incrementó la concentración de biomasa, Figura 37.

Este efecto es más evidente en la fracción de proteínas para la biomasa del consorcio D, y para proteínas y carbohidratos para la biomasa del consorcio S. Por otro lado, para la biomasa del consorcio D a la concentración de biomasa más baja de 25 g/L, la fracción de lípidos extraídos disminuye considerablemente a medida que aumenta el tiempo de contacto. Este resultado se atribuye a la degradación de los lípidos de la pared celular por el ozono y la baja permeabilidad de las células de microalgas durante el proceso de extracción debido a la baja disrupción celular. En el caso de biomasa del consorcio S la fracción de lípidos recuperados aumentó, ya que la

## 5. Resultados y Discusión

pared celular tiene una capa menos que en el caso de las células del consorcio D por lo es posible que se hayan tenido mayor eficiencia de disruptión celular.



**Figura 37.** Balance de masa para el pretratamiento con ozono de a) consorcio D a concentración de ozono de 9 mg O<sub>3</sub>/L y b) consorcio S a una concentración de ozono de 6 mg O<sub>3</sub>/L en función del tiempo de contacto y la concentración de biomasa. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos.

### 5.2.6 Comparación con estudios previos

La Tabla 16 muestra estudios previos para el pretratamiento con ultrasonido y ozono de distintas fuentes de biomasa. Ambos pretratamientos ultrasonido y ozono implicaron un gasto de energético de alrededor de dos órdenes de magnitud más altos que el pretratamiento con homogeneización a alta presión. Para el pretratamiento de biomasa con homogeneización a alta presión (concentración de 75 g/L de biomasa, una pasada, a 1200 bar), el consumo de energía es de 0.45 kWh/kg de biomasa seca, para lograr rendimientos de lípidos recuperados entre 60-

---

## 5. Resultados y Discusión

---

70% [241]. En este estudio, el pretratamiento con ultrasonido de biomasa del consorcio D tuvo un consumo de energía de 50 kWh/kg de biomasa seca (concentración de biomasa de 75 g/L e intensidad ultrasónica de 0.32 W/L), para un rendimiento máximo de lípidos recuperados de  $73 \pm 1\%$ . El tratamiento de biomasa del consorcio S tuvo un gasto energético de 200 kWh/kg de biomasa seca (concentración de biomasa 25 g/L e intensidad ultrasónica de 0.32 W/L) teniendo un rendimiento máximo de lípidos de  $90 \pm 2\%$ .

El pretratamiento con ozono de biomasa del consorcio D tuvo un gasto energético de 31 kWh/kg de biomasa seca (concentración de biomasa 25 g/L, concentración de ozono 9 mg O<sub>3</sub>/L, tiempo de contacto 5 min), para lograr un rendimiento de lípidos recuperados de  $48 \pm 1\%$ . El pretratamiento con ozono de biomasa del consorcio S tuvo un gasto energético de 30.5 kWh/kg de biomasa seca (concentración de biomasa 50 g/L, concentración de ozono 9 mg O<sub>3</sub>/L, tiempo de contacto 10 min), para lograr un rendimiento de lípidos recuperados de  $59 \pm 0.5\%$ . La mayoría de los trabajos encontrados en la literatura, que utilizan ultrasonido u ozono como pretratamiento, informan un consumo de energía entre 60 y 400 kWh/kg de biomasa seca.

El pretratamiento con ultrasonido propuesto en este estudio logró altos rendimientos de lípidos, proteínas y carbohidratos recuperados, para ambos tipos de biomasa, gracias a la alta disrupción celular inducida. Por otro lado, como el pretratamiento con ozono no logró la disrupción celular, el rendimiento de los biocomponentes recuperados fue bajo en comparación con el pretratamiento con ultrasonido. Sin embargo, hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que estudia la recuperación en tándem de lípidos, proteínas y carbohidratos de microalgas después del pretratamiento con ultrasonido u ozono. Además, el estudio presentado se realizó con biomasa de microalgas cultivadas en aguas residuales que, según la literatura, aumenta la viabilidad del proceso de biorrefinería de microalgas para la producción de biocombustibles.

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 16.** Sumario y comparación de casos de estudio del pretratamiento de bioma de microalgas con ultrasonido u ozono con este estudio.

Proceso	Especie	Consumo de energía (kWh/kg biomasa seca )	Eficiencia del pretratamiento	Referencia
<b>Biomasa no pretratada</b>	Consorcio D	-----	4% lípidos, 8% proteínas y 37% carbohidratos	<b>Este estudio</b>
<b>Homogenización a alta presión</b>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	0.45	60-70% lípidos	[241]
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	16.64	3% carbohidratos	[12]
<b>Ultrasonido</b>	<i>Chlorella vulgaris</i>	400	75% lípidos	[13]
	<i>Nannochloropsis oculata y Chlorella vulgaris</i>	187	38% proteínas	[223]
	<i>Chlorella vulgaris</i>	363	93% lípidos	[14]
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	2.58	73.2% lípidos	[241]
	Consorcio D	50	73% lípidos, 97% proteínas y 89% carbohidratos	<b>Este estudio</b>
	Consorcio S	200	89% lípidos, 83% proteínas y 77% carbohidratos	<b>Este estudio</b>
	Consorcio de microalgas	342	Cosecha y 16% lípidos	[222]
<b>Ozono</b>	Bagazo de caña	7.81	45% lignina, 48% hemicelulosa y 41% celulosa	[256]
	Cultivo mixto de microalgas	~60	81% glucosa	[255]
	Consorcio D	30.64	48% lípidos, 25% proteínas y 85% carbohidratos	<b>Este estudio</b>
	Consorcio S	30.5	37% lípidos, 55% proteínas y 92% carbohidratos	<b>Este estudio</b>

### 5.2.7 Intensificación de los procesos de extracción de biocomponentes

Se logró la intensificación del proceso de recuperación de biocomponentes para ambos pretratamientos. La eficiencia de solventes aumentó considerablemente después del pretratamiento con ultrasonido u ozono, en comparación con el proceso de recuperación de lípidos, en el caso de la biomasa no pretratada. El proceso de recuperación de lípidos generalmente tiene una eficiencia de solvente entre 0.05 y 0.1 g de lípidos/L de solvente [257, 258]. Para el proceso de recuperación de lípidos, llevado a cabo bajo las condiciones experimentales de este estudio, se observó una mayor eficiencia del solvente de hasta 5.6 y 3.6 g de lípidos/L solvente, en el caso de ultrasonido y ozono, respectivamente, Tabla 17. El aumento de la eficiencia del disolvente provocó una reducción del gasto de solvente en un 95% para el ultrasonido y 92% para el ozono. La eficacia del disolvente para la recuperación de proteínas incrementó de 3.7 g de reactivo de proteína/L a 25.6 g de reactivo de proteína/L utilizando biomasa después del pretratamiento con ultrasonido y hasta 18.9 g de reactivo de proteína/L después del pretratamiento con ozono, Tabla 17. El tiempo de extracción disminuyó considerablemente para todos los procesos de extracción de biocomponentes después del pretratamiento. Para ambos pretratamientos, el tiempo de extracción de lípidos, proteínas y carbohidratos se redujo en un 90%, 87.5% y 80%, respectivamente, Tabla 17.

Martin [259] descubrió que es posible lograr un balance energético positivo en una biorrefinería de microalgas mediante un proceso de extracción en húmedo, solo si el proceso acomoda una alta concentración de biomasa e incluye un proceso de recuperación eficiente con una baja relación solvente-biomasa. El estudio presentado aquí implementa un proceso con muchos de estos requisitos. En ambos procesos de pretratamiento -ultrasonido y ozono- se lograron a altas concentraciones de biomasa, en comparación con la investigación previa. En este estudio, se propusieron procesos de pretratamiento que podrían realizarse con biomasa húmeda a las concentraciones logradas durante la recolección de biomasa de microalgas por sedimentación (25-75 g/L). Esto puede reducir considerablemente los costos generales de procesamiento de una biorrefinería de microalgas, debido al hecho de que la recuperación de biocomponentes de biomasa de microalgas húmeda es una solución ideal para eliminar los costos e impactos asociados con los procesos de deshidratación y secado. En general, los estudios de evaluación del ciclo de vida de la producción de biodiesel a partir de microalgas han señalado que los pasos de secado y desecación de biomasa requieren la mayor cantidad de energía. Si la entrada de energía se reduce mediante la mejora o eliminación de las operaciones de secado y desagüe, el balance energético neto y el costo podrían ser positivos [260].

Los métodos de pretratamiento propuestos en este estudio, posiblemente reducen los costos de producción de biocombustibles con base en microalgas. Los procesos de recuperación de biocomponentes se lograron usando biomasa húmeda y la relación solvente-biomasa disminuyó considerablemente, en comparación con el proceso de extracción que usa biomasa no tratada. Además, el pretratamiento con ultrasonido eliminó la necesidad de la aplicación de químicos como NaOH para la extracción de proteínas. Sin embargo, no se consideró un análisis económico como parte de este estudio y se requiere trabajo futuro para afirmar las ventajas de costos.

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 17.** Sumario y comparación de casos publicados de la intensificación del proceso de recuperación de biocomponentes con ultrasonido u ozono con este estudio.

Espece	Biocomponentes recuperado	Tiempo de extracción	Mezcla/Solventes (v/v)	Eficiencia de solventes (g biocomponente/L solvente)	Referencia
<b>Métodos de extracción convencionales</b>					
<i>Tetraselmis suecica</i>	Lípidos	5 h	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH (0.7:3.3)	0.27	[258]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Proteínas	2 h	NaOH, pH 12	3.17	[223]
<i>Nannochloropsis salina</i>	Carbohidratos	5 h	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10%)	11.88	[224]
<b>Pretratamiento con ultrasonido</b>					
<i>Chlorophyta phylum</i>	Lípidos	5 h	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH (0.7:3.3)	2.02	[258]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Carbohidratos	-	Agua destilada	0.86	[12]
Consorcios D y S	Lípidos y carbohidratos	30 y 60 min	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (2:1) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10%)	5.6 y 5.18	<b>Este estudio</b>
<i>Porphyridium cruentum</i>	Proteínas	-	Agua destilada	4.35	[223]
Consorcios D y S	Proteínas	0	Agua destilada	25.6	<b>Este estudio</b>
<b>Pretratamiento con ozono</b>					
Consorcio de microalgas	Lípidos	12 h	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (2:1)	3.3	[222]
Cultivo mixto	Lípidos	12 h	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (2:1)	2.47	[3]
Consorcios D y S	Lípidos, proteínas y carbohidratos	30, 15 y 60 min	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (2:1), NaOH pH 11 y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10%)	3.6, 18.88 y 5.11	<b>Este estudio</b>

### 5.3 Identificación de proteínas y efecto del pretratamiento en la fracción proteica de biomasa microalgal

#### 5.3.1 Identificación de proteínas presentes en biomasa de los consorcios D y S

Esta sección del trabajo de tesis se enfocó en identificar las proteínas presentes en la biomasa de los consorcios D y S con el objetivo de evaluar potenciales aplicaciones futuras.

En el caso de la biomasa del consorcios D se identificaron siete proteínas, dentro de las proteínas identificadas se encuentran ATP sintasa subunidad beta, Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena larga, fotosistema II proteína D2 y gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, Tabla 18. Estas proteínas tienen importantes aplicaciones como marcadores biológicos, tratamiento para infecciones micobacterianas y promotores de producción de compuestos como isopreno, pineno y polihidroxicarotenos.

En el caso de biomasa del consorcios S se identificaron nueve proteínas, dentro de estas proteínas se encuentran Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena larga, Factor elongación Tu cloroplastico, Clorofila a-b proteína de unión al cloroplasto y ATP sintasa subunidad beta cloroplastico, Tablas 19 y 20. Estas proteínas tienen aplicaciones como biomarcadores biológicos para la detección de enfermedades y contaminación de suelo con Hg, precursores en la formación de biopelículas y, como tratamiento, para atender infecciones micobacterianas.

El objetivo principal de identificar las proteínas presentes en la biomasa de microalgas ambos consorcios es darle un valor adicional a la biomasa a partir de su fracción proteica, debido a que las biocomponentes que son más comúnmente aplicados a la producción de biocombustibles son los lípidos y los carbohidratos. Los resultados encontrados en las Tablas 18, 19 y 20 muestran que la fracción proteica de estos tipos de biomasa puede darle un alto valor añadido a la biomasa de microalgas, debido a que tienen aplicaciones importantes en el área médica. Sin embargo, es importante mencionar que las microalgas estudiadas fueron cultivadas en agua residual, lo cual limita de forma importante su aplicación.



## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 18.** Proteínas identificadas mediante análisis de péptidos por espectrometría de masas en biomasa del consorcio D, [261].

Proteína	Peso molecular (KDa)	pI (pH)	Resultado	Cobertura Secuencia (%)	Aminoácidos en mayor proporción				Posibles aplicaciones
					Aminoácido	%	Aminoácido	%	
ATP sintasa subunidad alfa	54.4	4.96	438.4	2.57	Ala	7.5	Ile	8.3	Composición y métodos para el tratamiento de infecciones por micobacterias
					Arg	5.8	Leu	11	
					Asp	5.0	Lys	6.5	
					Glu	5.4	Ser	6.2	
					Gly	7.7	Val	8.3	
ATP sintasa subunidad alfa cloroplasto	54.2	4.91	340.24	14.59	Ala	8.1	Ile	8.4	-----
					Arg	5.1	Lue	9.7	
					Gln	5.9	Ser	6.1	
					Glu	6.1	Thr	7.1	
					Gly	8.1	Val	9.3	
ATP sintasa subunidad beta (Fragmento)	43.7	5.10	511.05	17.12				Marcadores biológicos relacionados con la fertilidad	
F0 F1 ATP sintasa subunidad beta (Fragmento)	43.3	5.13	547.13	17.07				-----	
Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena larga (Fragmento)	42.7	8.1	941.5	5.19				Entrega dirigida intracelular de productos de expresión	
Fotosistema II proteína D2 (Proteína Q (A) fotosistema)	39.3	5.88	398.14	5.39	Ala	9.6	Phe	10.7	Microorganismos productores de isopreno, pineno y polihidroxicanoatos
					Gly	9.6	Ser	5.6	
					Ile	5.1	Thr	7.0	
					Leu	11.5	Val	6.5	
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	36.6	5.96	1801.5	6.82	Ala	11.5	Lys	7.4	Promotores de la expresión de genes en levaduras oleaginosas
					Asp	7.4	Ser	5.9	
					Gly	8.6	Thr	8.3	
					Ile	6.2	Val	11.2	

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 19.** Proteínas identificadas mediante análisis de péptidos por espectrometría de masas en biomasa del consorcio S, [261].

Proteína	Peso molecular (KDa)	pI (pH)	Resultado	Cobertura Secuencia (%)	Aminoácidos en mayor proporción				Posibles aplicaciones
					Aminoácido	%	Aminoácido	%	
ATP sintasa subunidad alfa cloroplastico	54.6	5.07	3397.4	53.45	Ala	8.1	Ile	8.4	Composición y métodos para el tratamiento de infecciones por micobacterias
					Arg	5.1	Lue	9.7	
					Gln	5.9	Ser	6.1	
					Glu	6.1	Thr	7.1	
					Gly	8.1	Val	9.3	
Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena larga	52.5	6.17	1554.7	58.95	Ala	9.6	Leu	8.4	Entrega dirigida intracelular de productos de expresión
					Arg	6.1	Lys	5.6	
					Asp	5.6	Thr	5.8	
					Glu	7.5	Val	6.7	
					Gly	9.8			
ATP sintasa subunidad beta cloroplastico	51.7	5.38	4091.2	94.58	Ala	8.8	Lys	5.7	Marcadores biológicos relacionados con la fertilidad
					Glu	6.5	Ser	7.6	
					Gly	8.6	Thr	5.3	
					Ile	7.6	Val	8.6	
					Leu	8.8			
Factor elongación Tu cloroplastico	45.7	5.28	1592.9	94.03	Ala	8.6	Leu	6.6	Formación de biopelículas
					Asp	6.8	Lys	5.9	
					Glu	7.8	Thr	9.0	
					Gly	9.5	Val	8.8	
					Ile	8.1			
Fotosistema II proteína D2	39.6	5.35	1208.2	50.42	Ala	9.6	Phe	10.7	-----
					Gly	9.6	Ser	5.6	
					Ile	5.1	Thr	7.0	
					Leu	11.5	Val	6.5	

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 20.** Proteínas identificadas mediante análisis de péptidos por espectrometría de masas en biomasa del consorcio S, [261].

Proteína	Peso molecular (KDa)	pI (pH)	Resultado	Cobertura Secuencia (%)	Aminoácidos en mayor proporción				Posibles aplicaciones
					Aminoácido	%	Aminoácido	%	
Clorofila a-b proteína de unión al cloroplasto	26.68	6.37	3603.5	49.01	Ala	10.5	Phe	5.61	Biomarcadores para detectar suelo contaminado con Hg
					Glu	6.0	Pro	7.11	
					Gly	12.3	Ser	7.11	
					Leu	9.36	Val	6.36	
					Lys	5.24			
ATP sintasa subunidad beta cloroplastico	20.42	9.32	892.94	64.04	Ala	10.4	Leu	9.3	-----
					Arg	5.2	Ser	6.7	
					Glu	5.2	Thr	6.2	
					Gly	10.4	Val	11.4	
Fotosistema I P700 clorofila a apoproteína A1	10.6	6.61	1001.9	91.49	Ala	11.6	Leu	11.6	-----
					Asp	5.3	Phe	6.3	
					Gly	6.3	Ser	7.4	
					His	6.3	Thr	8.4	
					Ile	9.5	Val	7.4	
Fotosistema II proteína centro de reacción H	9.13	4.43	1370.2	45.35	Asn	6.0	Phe	6.0	-----
					Gly	10.4	Ser	7.5	
					Ile	9.0	Val	7.5	
					Leu	16.4			

## 5. Resultados y Discusión

### 5.3.2 Efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono en el perfil electroforético de las proteínas

Con el objetivo de estudiar el efecto de ambos pretratamientos en la estructura, solubilidad y propiedades térmicas de las proteínas de microalga, se eligieron los pretratamientos que presentaron mayor rendimiento de proteínas recuperadas para ambos tipos de biomasa, los pretratamientos estudiados se muestran en la Tabla 21.

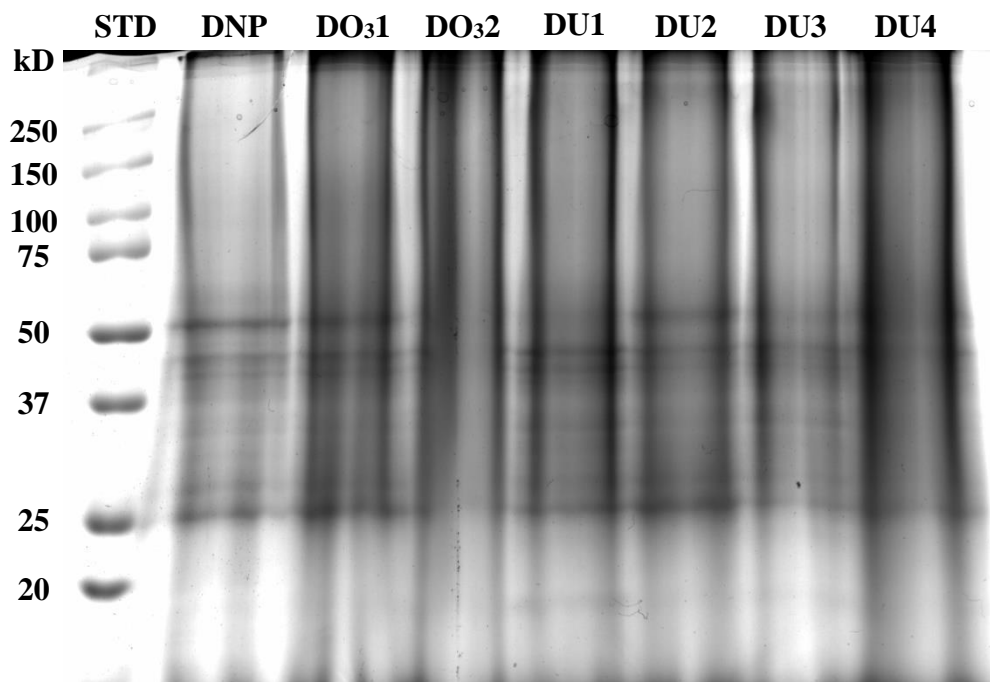
**Tabla 21.** Condiciones experimentales estudiadas en el efecto del pretratamiento sobre la fracción proteína de biomasa de los consorcios D y S.

Biomasa	Pretratamiento	Condiciones de pretratamiento	Nombre de la muestra
<b>Consortio D</b>	Sin pretratamiento		DNP
	Ultrasonido	25 g/L, 125 kWh/kg biomasa seca, 0.32 W/L	DU1
		25 g/L, 200 kWh/kg biomasa seca, 0.32 W/L	DU2
		75 g/L, 50 kWh/kg biomasa seca, 0.32 W/L	DU3
		75 g/L, 125 kWh/kg biomasa seca, 0.32 W/L	DU4
	Ozono	25 g/L, 9 mg O <sub>3</sub> /L, 5 min	DO <sub>3</sub> 1
		25 g/L, 9 mg O <sub>3</sub> /L, 15 min	DO <sub>3</sub> 2
	<b>Consortio S</b>	Sin pretratamiento	
Ultrasonido		25 g/L, 50 kWh/kg biomasa seca, 0.32 W/L	SU1
		25 g/L, 200 kWh/kg biomasa seca, 0.32 W/L	SU2
Ozono		75 g/L, 9 mg O <sub>3</sub> /L, 5 min	SO <sub>3</sub> 1
		75 g/L, 9 mg O <sub>3</sub> /L, 15 min	SO <sub>3</sub> 2

En la Figura 38 y Tabla 22 se muestra el efecto de ambos pretratamientos sobre el peso molecular de las proteínas presentes en la biomasa del consorcio D. En el perfil de SDS-PAGE se identificaron principalmente cinco conjuntos de bandas, que se encuentran a 54, 43, 39, 36 y 25 kD, respectivamente. El análisis densitométrico y el perfil de SDS PAGE indicaron la reducción de la concentración aparente de las proteínas e incremento de la degradación a medida que aumentaba la energía aplicada durante el pretratamiento con ultrasonido. Las proteínas que se mostraron más susceptibles al pretratamiento con ultrasonido fueron las proteínas con peso molecular de 39 y 36 kD, ya que éstas son las proteínas que se degradan completamente a medida que aumenta la energía aplicada. Mientras que a estas mismas condiciones (incremento de energía aplicada) las proteínas con peso molecular de 25 kD incrementan su concentración aparente, esto también se puede deber a la fragmentación de

## 5. Resultados y Discusión

proteínas más grandes. Por otra parte, con los experimentos realizados también fue posible identificar el efecto de la concentración de biomasa en las proteínas. En el perfil de SDS-PAGE de las muestras DU1 y DU4 se puede observar que el incremento de la concentración de biomasa durante el pretratamiento aumentó considerablemente la degradación de las proteínas presentes; esto se debe a que el pretratamiento con ultrasonido se vuelve más eficiente a medida que incrementa la concentración de biomasa de 25 a 75 g/L como ya se discutió en la sección 5.2.1.



**Figura 38.** Perfil de SDS-PAGE de proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ozono (DO<sub>31</sub> y DO<sub>32</sub>) y ultrasonido (DU1, DU2, DU3 y DU4).

**Tabla 22.-** Densitometría del perfil de SDS-PAGE de proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ozono (DO<sub>31</sub> y DO<sub>32</sub>) y ultrasonido (DU1, DU2, DU3 y DU4).

Proteína	Peso molecular (kD)	Concentración relativa (g/L)							
		DNP	DO <sub>31</sub>	DO <sub>32</sub>	DU1	DU2	DU3	DU4	
ATP sintasa subunidad alfa + ATP sintasa subunidad alfa cloroplástico	54.4 y 54.2	1.09	0.96	-	0.77	0.94	0.84	-	
ATP sintasa subunidad beta (Fragmento) + F0 F1 ATP sintasa subunidad beta Fragmento) + Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena larga (Fragmento)	43.7, 43.3 y 42.7	0.64	0.67	-	1.14	0.72	1.22	-	
Fotosistema II proteína D2 + Fotosistema II D2 proteína (Fotosistema Q (A) proteína)	39.5 y 39.3	0.50	0.74	-	1.06	0.84	0.80	-	
Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	36.6	0.40	-	-	-	-	-	-	
No identificada	25	0.66	1.08	-	0.80	0.98	0.40	0.67	

---

## 5. Resultados y Discusión

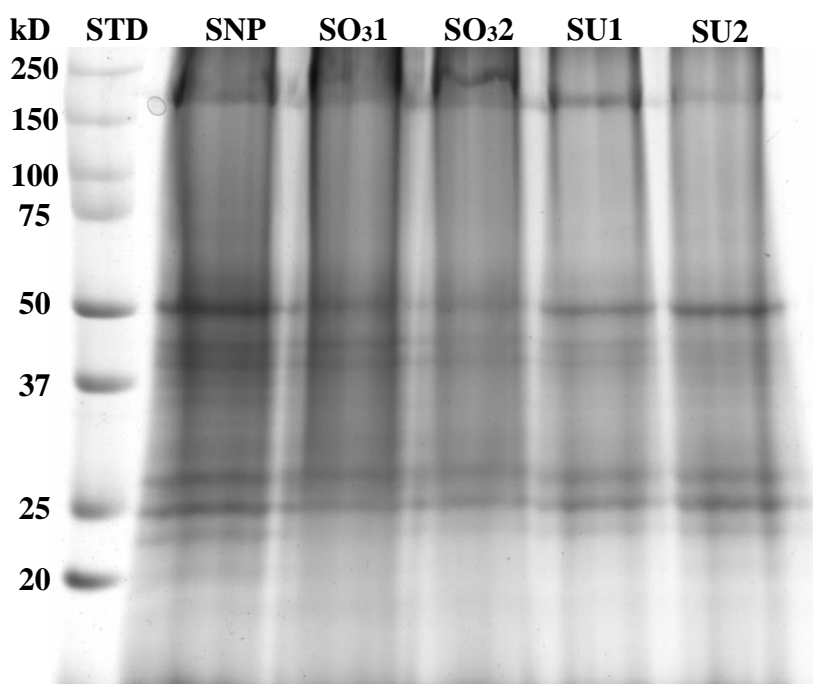
---

En el caso del pretratamiento con ozono, la concentración relativa de las proteínas disminuyó y la degradación de las proteínas aumentó a medida que incrementó el tiempo de contacto con ozono. La concentración relativa de proteínas se redujo después de 5 minutos de tiempo de contacto con ozono para las bandas a 50, 36.6 y 25 kD, estas bandas se vuelven prácticamente imperceptibles después de 15 minutos de tiempo de contacto. Cuando el tiempo de contacto incrementó a 15 minutos para el pretratamiento con ozono, la cantidad de proteína degradada aumentó considerablemente y, en consecuencia, en el perfil electroforético solo se puede observar el degradado de proteínas que se adhiere a las orillas del carril. Sin embargo, no se observa la presencia de bandas de proteína. Este mismo efecto se observa en la muestra DU4 que es la muestra que fue pretratada con ultrasonido a la energía más alta aplicada (200 kWh/kg). Por lo tanto se omitió el análisis densitométrico de estas dos bandas, ya que puede conducir a errores importantes en el análisis.

El perfil de SDS-PAGE y el análisis densitométrico de las proteínas del consorcio S indicaron agregación de proteínas, Figura 39. Esto se debe a la aparición de una banda alrededor de 150 kD, tanto para el perfil que corresponde a las proteínas de biomasa sin pretratamiento y pretratadas con ultrasonido u ozono. La agregación de proteínas implica la disrupción de los enlaces electrostáticos, de hidrógeno y las interacciones de Vander Waals, lo que conlleva a la desnaturalización de proteínas y formación de nuevos enlaces intermoleculares [262]. El pretratamiento con ultrasonido produce cavitación, esfuerzo cortante, turbulencia, alta presión y generación de radicales en solución [263]. Además, el colapso de las burbujas de cavitación resulta en la generación de altas temperaturas dentro de las burbujas, a pesar del control de temperatura [264]. Las altas temperaturas dentro de la solución tienen un efecto directo sobre la conformación de las cadenas de polipéptidos en el nivel de su estructura cuaternaria, terciaria y secundaria, y pueden conducir a un despliegue inducido por la temperatura que promueve la agregación [265]. El calor producido durante el pretratamiento con ultrasonido también induce cambios en los grupos -SH y enlaces S-S a través de la oxidación de los grupos SH, que también se pueden deber a la sonólisis del agua [266]. Varios estudios han informado cambios en las propiedades de las proteínas como resultado de la sonicación. Stathpulos y colaboradores observaron la formación de agregados durante la sonicación de proteínas [267]. Descubrieron que estos agregados tienen un alto contenido de láminas- $\beta$  y que las proteínas que contienen una estructura  $\alpha$ -helicoidal nativa mostraron un aumento en la estructura de láminas- $\beta$  en los agregados. Gulserren y colaboradores encontraron que el número de grupos tiol reactivos en BSA disminuyó después de la sonicación. Atribuyeron la disminución del número de grupos tiol a la formación de agregados de proteínas [268].

En el caso del pretratamiento con ozono, el proceso de oxidación de ciertos aminoácidos como Met, Tyr, Trp, His, Cys y Phe inducen la agregación de proteínas [269]. Una proteína puede sufrir varias vías de agregación, y el estado inicial de una proteína que es propensa a la agregación puede diferir. La susceptibilidad de las proteínas a la agregación puede estar impulsada por la estructura nativa, por una estructura degradada o modificada o por una estructura parcial o totalmente desplegada [265]. La formación de agregados no covalentes es a través de fuerzas débiles, como interacciones de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, mientras que los agregados covalentes se forman a mediante enlaces disulfuro a través de grupos tiol libres o mediante la formación de enlaces no disulfuro como formación de ditirosina [270]. Además, se ha descrito que la acción del ozono convierte el grupo tiol de cisteína en disulfuros por medio de reticulación, lo que desnaturaliza las proteínas mediante la modificación de su conformación nativa [266, 271].

## 5. Resultados y Discusión



**Figura 39.** Perfil de SDS-PAGE de proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ozono ( $SO_31$  y  $SO_32$ ) y ultrasonido (SU1 y SU2).

**Tabla 23.-** Densitometría del perfil de SDS-PAGE de proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ozono ( $SO_31$  y  $SO_32$ ) y ultrasonido (SU1 y SU2).

Proteína	Peso molecular (KDa)	Concentración relativa (g/L)				
		SNP	$SO_31$	$SO_32$	SU1	SU2
Agregados	150	0.78	1.55	0.71	0.50	0.78
ATP sintasa subunidad alfa cloroplástico	54.6	0.75	0.079	0.49	0.48	0.66
Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena larga	52.5	1.02	0.51	0.34	0.48	0.26
ATP sintasa subunidad beta cloroplástico	51.7	0.47	0.58	0.24	0.27	0.52
Factor de elongación Tu cloroplástico	45.7	0.45	-	-	-	-
Fotosistema II proteína D2	39.6	0.75	-	-	-	-
Clorofila a-b proteína de unión cloroplástica	26.4	0.99	0.77	0.39	0.66	0.68
Clorofila a-b proteína de unión cloroplástica	26.6	0.64	0.76	0.22	0.47	0.59
Clorofila a-b proteína de unión cloroplástica	27	0.46	0.25	0.25	0.47	0.33
Clorofila a-b proteína de unión cloroplástica (fragmento)	24	0.33	0.32	-	-	0.19
ATP sintasa subunidad beta cloroplástico	20	0.20	0.30	-	-	0.21
Fotosistema I P700 clorofila a apoproteína	10.6	-	-	-	-	-
Fotosistema II proteína de centro de reacción	9.13	-	-	-	-	-

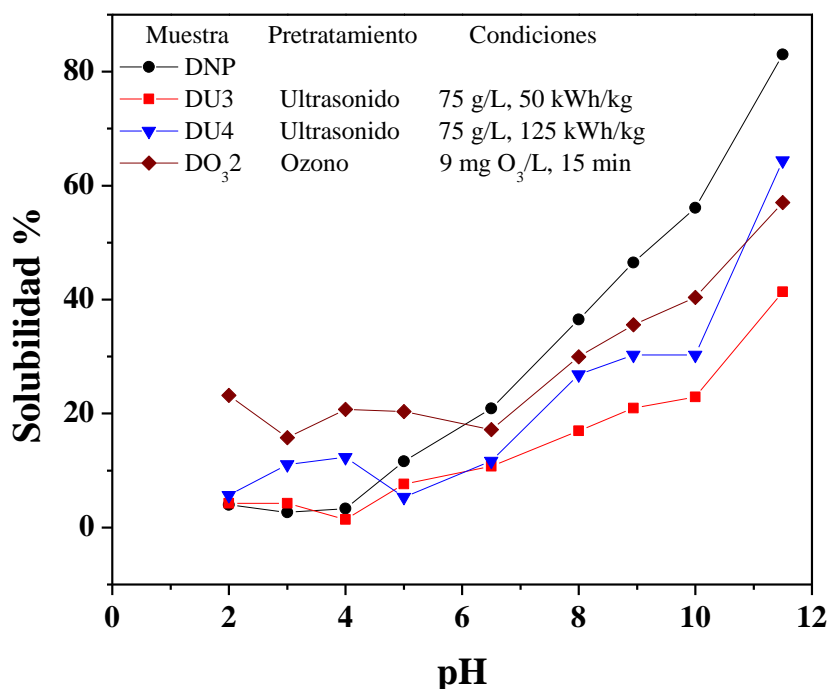
## 5. Resultados y Discusión

En el análisis densitométrico se muestra que la concentración relativa de estos agregados aumenta con la energía aplicada, en el caso del pretratamiento con ultrasonido, Tabla 23. Por el contrario, la concentración relativa de los agregados disminuye con el incremento del tiempo de contacto durante el pretratamiento con ozono. Esto se puede deber al fuerte poder oxidante del ozono, que promueve a su vez la degradación de las proteínas.

Por otra parte, se identificaron 12 bandas pertenecientes a conjuntos de proteína en el perfil electroforético de las proteínas presentes en la biomasa del consorcio S. Las bandas que resultaron más susceptibles a ambos pretratamientos de biomasa fueron las que se encuentran a 45.7, 39.6, 10.6 y 9.13 kD. Ya que estas cuatro bandas desaparecen cuando la biomasa se somete a cualquiera de los dos pretratamientos, Tabla 23. En el caso del pretratamiento de biomasa con ultrasonido, se observa que a medida que incrementó la energía aplicada la concentración relativa de las bandas aumentó. Caso contrario con el pretratamiento con ozono, ya que a medida que aumenta el tiempo de contacto la concentración relativa de las bandas disminuye.

### 5.3.3 Efecto del pretratamiento en la solubilidad de proteínas

El efecto del pretratamiento de la biomasa con ultrasonido u ozono en la solubilidad de las proteínas se estudió a partir de una curva de solubilidad a diferentes pH. La solubilidad es la medida más práctica de desnaturalización y formación de agregados de las proteínas y, por lo tanto, un buen índice de su funcionalidad. Las superficies de las proteínas tienen cargas netas dependiendo del pH de su entorno, debido a su contenido de aminoácidos. Una proteína muestra una solubilidad mínima cuando tiene una carga neta de cero, es decir, números iguales de cargas positivas y negativas en su superficie, esto se denomina punto isoeléctrico de la proteína. En este punto hay una solubilidad mínima y las proteínas tenderán a agregarse. A valores de pH superiores al punto isoeléctrico, la proteína tiene una carga neta negativa. A valores de pH inferiores del punto isoeléctrico, la proteína tendrá una carga neta positiva. En ambos casos la presencia de cargas superficiales pronunciadas resultará en repulsión intermolecular y la solubilidad incrementará [272].



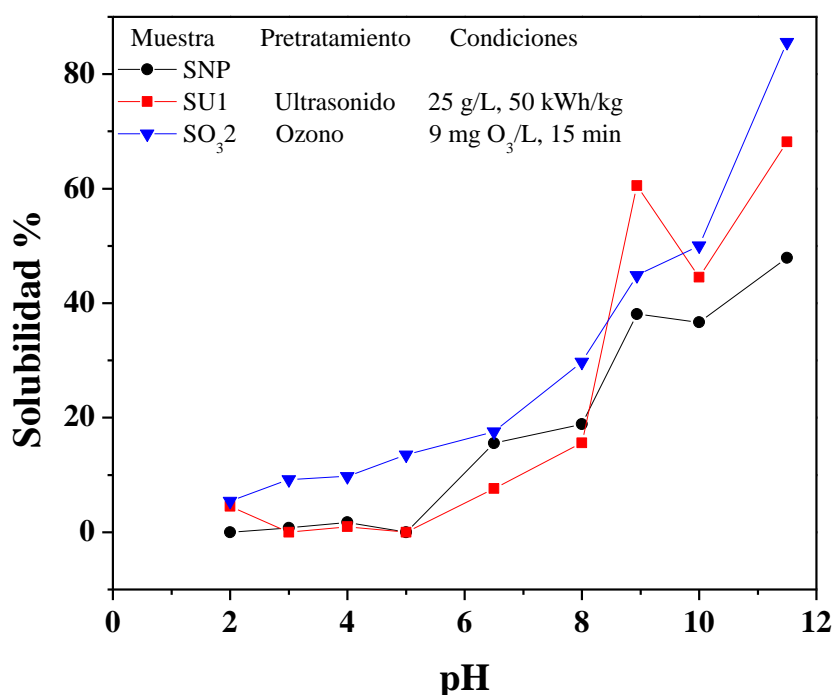
**Figura 40.** Efecto del pretratamiento de ultrasonido u ozono sobre la solubilidad de proteínas de biomasa del consorcio D.



## 5. Resultados y Discusión

En la Figura 40 se muestra el efecto de ambos pretratamientos en la solubilidad de proteínas del consorcio D. Ambos pretratamientos incrementan la solubilidad de las proteínas en aproximadamente un 10% a pH ácidos, en comparación con las proteínas de biomasa no pretratada. Efecto contrario, ambos pretratamientos disminuyen la solubilidad de las proteínas en un 20% y 40% para ultrasonido y 30% para ozono a pH alcalinos. La baja solubilidad de las proteínas se atribuye a la formación de complejos interpoliméricos formados por fuertes interacciones electrostáticas. Para los aislados de proteína obtenidos después del pretratamiento con ultrasonido, la solubilidad incrementó con el aumento de la energía aplicada. Sin embargo, es menor en comparación con la proteína extraída de biomasa no pretratada. El aumento de la solubilidad con el incremento de la energía aplicada se puede deber a grupos hidrofílicos que se han unido a la proteína durante el pretratamiento. Además, el pretratamiento con ultrasonido podría desplegar las proteínas y romper los agregados de proteínas insolubles en solubles, lo que también contribuye al aumento de la solubilidad [273]. El aumento de la solubilidad de las proteínas a pH ácidos se puede deber al aumento de grupos hidroxilo en la superficie de la proteína, causados por reacciones de radicales. Esto resulta apropiado ya que la proteína que se obtiene después del pretratamiento con ozono es la que presenta mayor solubilidad a pH ácido. Por otra parte, el aumento en la degradación de proteína también muestra un efecto importante en la solubilidad. La solubilidad de las proteínas aumentó cuando la concentración de proteína degradada incremento.

Para el caso de las proteínas de biomasa del consorcio S, ambos pretratamientos incrementaron la solubilidad. Particularmente, el pretratamiento con ozono incrementó la solubilidad de las proteínas en todo el rango de pH en comparación con las proteínas de biomasa no pretratada, Figura 41.



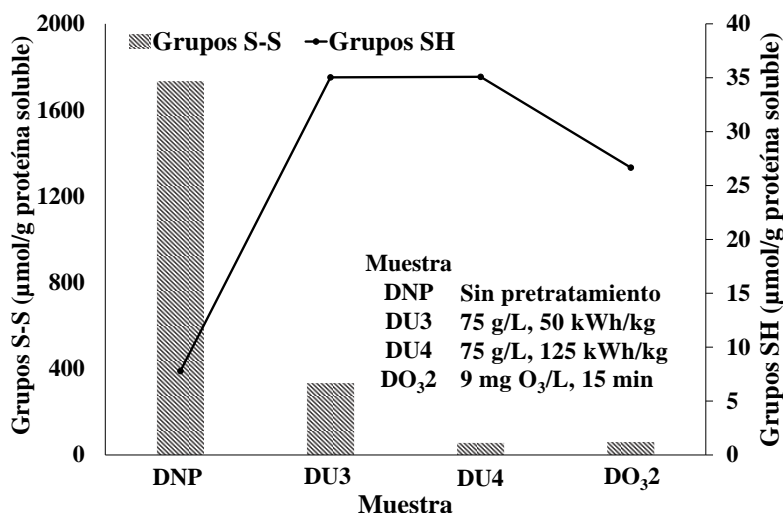
**Figura 41.** Efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono en la solubilidad de proteínas de biomasa del consorcio S.

Como se observó en el perfil electroforético de las proteínas de biomasa del consorcio S, tanto los agregados como las proteínas en general se ven afectados durante el pretratamiento con ozono. El aumento en la solubilidad de las proteínas puede deberse al cambio conformacional de las proteínas y a la formación de agregados de proteínas solubles, a partir de proteínas insolubles durante ambos pretratamientos [274]. Para las tres muestras que se observan en la

## 5. Resultados y Discusión

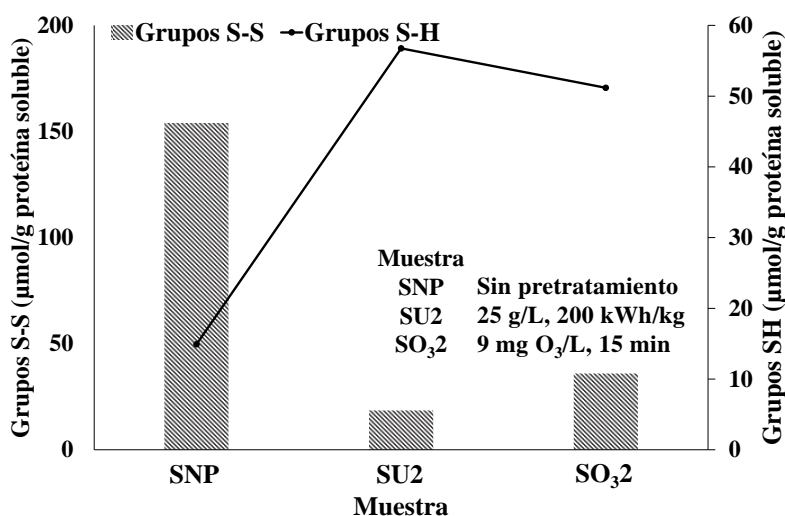
Figura 40 existe un incremento en la solubilidad a pH 8.94, particularmente en la fracción de proteínas de biomasa pretratada con ultrasonido. Esto se puede deber a la interacción del buffer que fue utilizado como solvente (Tris base) con las proteínas. En particular el buffer Tris base se caracteriza por romper las interacciones electrostáticas (puentes salinos) presentes en las proteínas, aunque la proteína de biomasa no pretratada ya muestra este efecto. Este efecto se hace más evidente cuando se aplica pretratamiento; esto se puede atribuir al incremento en la cantidad de iones presentes en la proteína, como consecuencia de las reacciones de radicales que se pueden llevar a cabo durante ambos pretratamientos.

### 5.3.4 Efecto del pretratamiento en el contenido de grupos disulfuro y sulfhidrilo



**Figura 42.** Efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono en el contenido de grupos disulfuro y sulfhidrilo en proteínas de biomasa del consorcio D.

Para las proteínas de biomasa del consorcio D se observa que el contenido de grupos disulfuro disminuye considerablemente con la aplicación de ambos pretratamientos, lo que indica que los grupos disulfuro presentes en las moléculas de proteína fueron muy susceptibles a ambos pretratamientos, Figura 42. Es posible que la ubicación de los grupos disulfuro los vuelva vulnerables a la degradación [267]. Por otra parte, el alto contenido de grupos disulfuro en las proteínas puede ayudar a entender algunas de las propiedades que se estudiarán más adelante. La tendencia de una proteína a formar enlaces cruzados está determinada por su estructura primaria.



**Figura 43.** Efecto del pretratamiento con ultrasonido u ozono en el contenido de grupos disulfuro y sulfhidrilo en proteínas de biomasa del consorcio S.

## 5. Resultados y Discusión

El contenido de grupos sulfhidrilo incrementó considerablemente cuando es aplicado cualquiera de los dos pretratamientos, Figura 42. El aumento del contenido de grupos SH se puede atribuir al rompimiento de enlaces disulfuro que causó la reducción de grupos S-S para formar grupos SH. El mismo efecto se puede observar en las proteínas de biomasa del consorcio S pretratadas con ultrasonido y ozono, Figura 43. Sin embargo, el contenido de grupos sulfhidrilo aumenta en mayor proporción en las proteínas del consorcio S; esto puede explicar que las proteínas del consorcio S sean más solubles que las proteínas del consorcio D.

### 5.3.5 Efecto del pretratamiento en las propiedades térmicas de las proteínas

El efecto del pretratamiento con ultrasonido sobre la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) y entalpia de desnaturalización ( $\Delta H_d$ ) de las proteínas del consorcio D se muestran en la Tabla 24 y Figura 44.

**Tabla 24.** - Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la  $T_g$ ,  $T_d$  y  $\Delta H_d$  de las proteínas de biomasa del consorcio D.

Muestra	Condición experimental (a, b)	$T_g$ (°C)	$T_d$ (°C)	$\Delta H_d$ (J/g)
DNP		248		
DU1	25 <sup>a</sup> , 125 <sup>b</sup>	167	242	91
DU2	25 <sup>a</sup> , 200 <sup>b</sup>	174	259	50 ± 1
DU3	75 <sup>a</sup> , 50 <sup>b</sup>	175	262	75 ± 1
DU4	75 <sup>a</sup> , 125 <sup>b</sup>	167	209	46

<sup>a</sup>[Biomasa] (g/L)

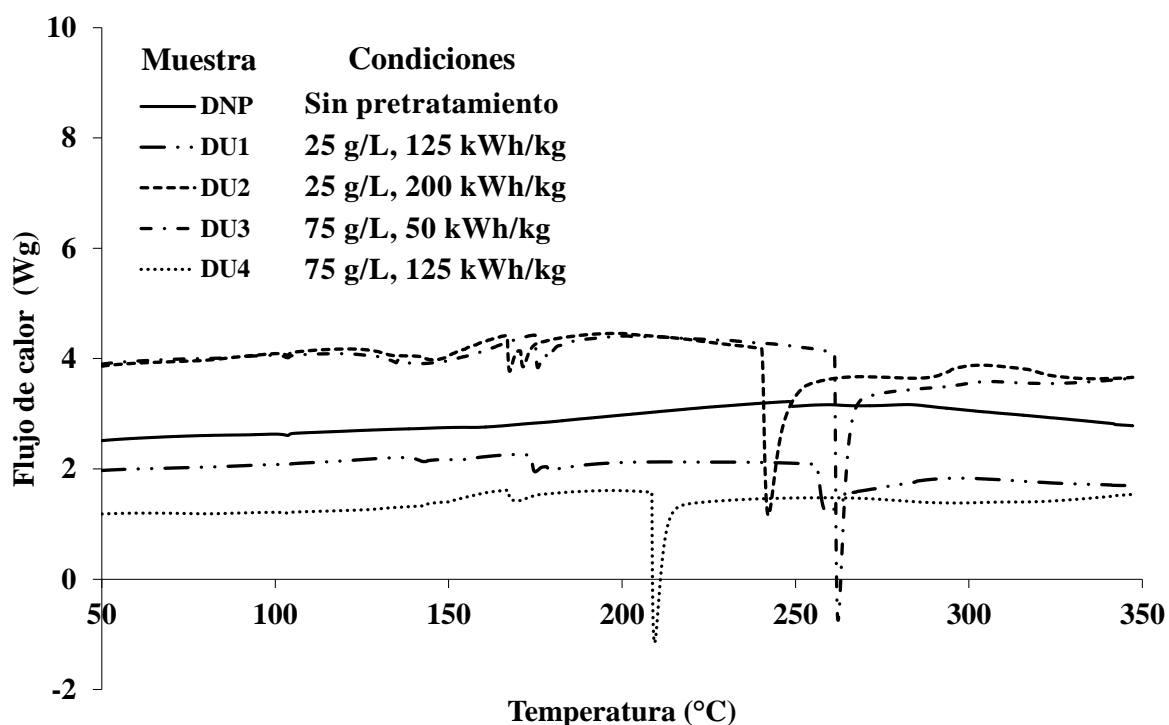
<sup>b</sup>Energía aplicada (kWh/kg biomasa seca)

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

Los termogramas de DSC mostraron una clara disminución de alrededor de 100 °C en la temperatura de transición vítrea del extracto proteico cuando es aplicado algún pretratamiento, ultrasonido u ozono; en comparación con la temperatura de transición vítrea de las proteínas de biomasa no pretratada. Así mismo, la temperatura y entalpia de desnaturalización muestran una clara disminución; esto se puede observar a pesar de que no fue posible detectar estos valores mediante los estudios realizados por calorimetría diferencial de barrido. La temperatura máxima a la que se realizó la rampa de temperatura fue 350 °C. Esto sugiere que el valor de temperatura y entalpia de desnaturalización se encuentran por arriba de este valor. Este resultado es consistente con los resultados del contenido de grupos disulfuro en las proteínas de biomasa no pretratada, como se muestra en la sección 5.3.4. El alto contenido de grupos disulfuro indica entrecruzamiento entre las moléculas de proteína, lo que las vuelve estructuras muy rígidas con poca movilidad. Los cambios en la estructura de las proteínas de biomasa del consorcio D y el comportamiento térmico se pueden atribuir a los fenómenos de cavitación y turbulencia producidos en la solución durante el pretratamiento con ultrasonido. Estos efectos causan la ruptura de enlaces, lo que resulta en la división de la estructura molecular de las proteínas [264]. Observaciones similares fueron reportadas por Jambrak y colaboradores para aislados de  $\alpha$ -lactalbúmina y proteína de suero. Observaron la disminución del peso molecular de aislados de proteína de suero y la  $\alpha$ -lactoalbúmina después del pretratamiento con ultrasonidos [275]. Además, Hu y colaboradores estudiaron el efecto del ultrasonido en los enlaces de proteínas. Descubrieron que las cavitaciones de ultrasonido producen un flujo turbulento y fuerzas de corte que pueden crear una gran área interfacial entre el aire y el agua y

## 5. Resultados y Discusión

alterar los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas que tienen un papel principal en el comportamiento intermolecular y térmico de las proteínas [276].



**Figura 44.** Termogramas de DSC de proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ultrasonido.

Por otra parte, se pueden observar ligeros cambios en el comportamiento térmico de las proteínas después del pretratamiento con ultrasonido. Existen variaciones en la  $T_g$  y disminución en la  $T_d$  y  $\Delta H_d$  a medida que aumenta la energía aplicada. Esto sugiere la disminución de los grupos disulfuro y la desnaturalización de las proteínas. Este resultado también se puede confirmar con la disminución de grupos disulfuro y aumento de grupos sulfhidrilo, a medida que aumenta la energía aplicada durante el pretratamiento con ultrasonido, lo que indica el despliegue de la estructura de las proteínas. El perfil de SDS-PAGE también mostró un notable aumento en la degradación de proteínas en las muestras pretratadas con ultrasonido.

El efecto del pretratamiento con ozono sobre las propiedades térmicas de las proteínas de biomasa del consorcio D se muestra en la Tabla 25 y Figura 45.

**Tabla 25.-** Efecto del pretratamiento con ozono en la  $T_g$ ,  $T_d$  y  $\Delta H_d$  de las proteínas de biomasa del consorcio D.

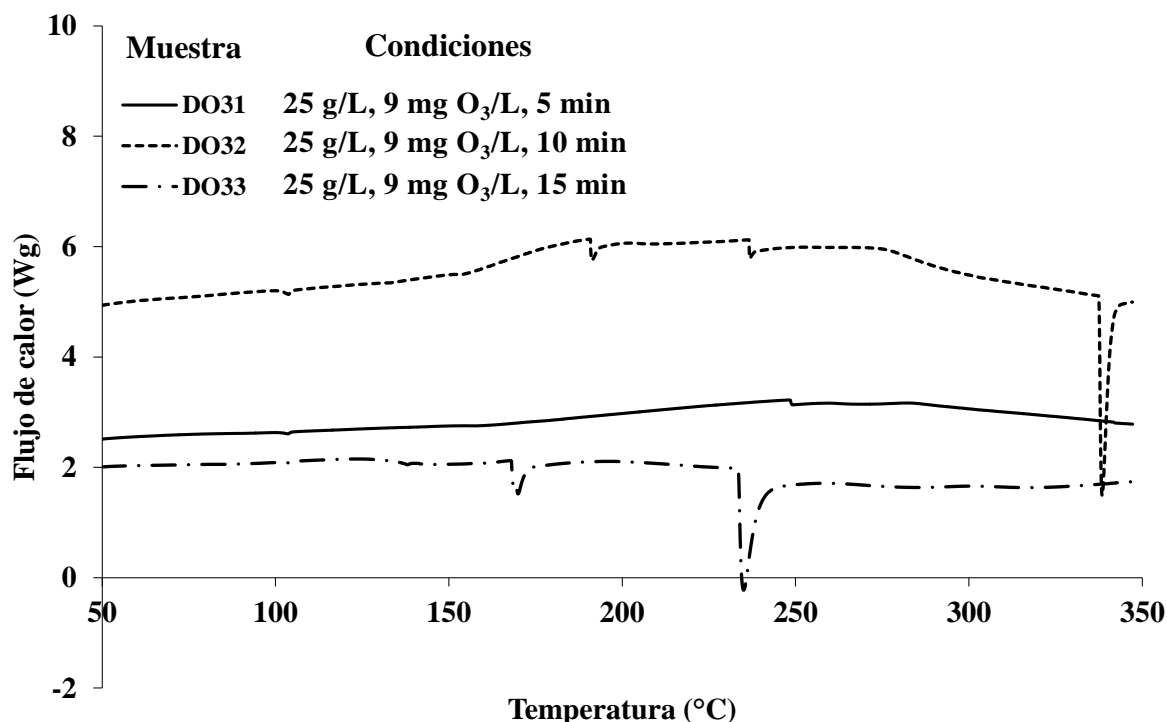
Muestra	Condiciones experimentales (a, b, c)	$T_g$ (°C)	$T_d$ (°C)	$\Delta H_d$ (J/g)
DNP		249		
DO <sub>3</sub> 1	25 <sup>a</sup> , 9 <sup>b</sup> , 5 <sup>c</sup>	249		
DO <sub>3</sub> 2	25 <sup>a</sup> , 9 <sup>b</sup> , 10 <sup>c</sup>	191, 237	338	47
DO <sub>3</sub> 3	25 <sup>a</sup> , 9 <sup>b</sup> , 15 <sup>c</sup>	168	235	51

a [Biomasa] (g/L)

b [O<sub>3</sub>] (mg O<sub>3</sub>/L)

c Tiempo (min)

Los datos se muestran como media  $\pm$  DS, derivados de mediciones por triplicado.



**Figura 45.** Termogramas de DSC de proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ozono.

El pretratamiento de proteínas de biomasa del consorcio D con ozono produjo la desnaturalización de proteínas, ya que la  $T_g$ ,  $T_d$  y  $\Delta H_d$  de las proteínas disminuyeron a medida que aumentó el tiempo de contacto con ozono, Tabla 24. La disminución continua de la  $T_g$ ,  $T_d$  y  $\Delta H_d$  a medida que aumenta el tiempo de contacto con ozono se correlaciona con la interrupción de una fracción de las fuerzas responsables de la estabilidad de las estructuras de proteínas terciarias y secundarias, ya que la reducción de las fuerzas que mantienen unidas las cadenas de proteínas modifica su comportamiento térmico al aumentar la movilidad molecular y disminuir la viscosidad [277].

Los resultados encontrados en el termograma de DSC son consistentes con la información encontrada en la literatura. Varios estudios han investigado la interacción de diferentes proteínas y aminoácidos específicos como la metionina con el ozono [278, 279]. Los estudios han demostrado que el ozono causa la oxidación del esqueleto polipeptídico de la proteína, la reticulación proteína-proteína, la división del enlace peptídico y un rango de modificación de la cadena lateral de aminoácidos que produce cambios en las hélices- $\alpha$  y las láminas- $\beta$  plegadas, que las que definen la estructura secundaria y terciaria de las proteínas [272, 280]. Esto se debe a que los aminoácidos son objetivos potenciales de oxidación por el ozono, especialmente las unidades de aminoácidos aromáticos, de los cuales, el más sensible es el triptófano, seguido de la tirosina [279]. Esto concuerda con la información encontrada en el perfil electroforético de la proteína, donde se muestran cambios en el peso molecular de las proteínas. Se ha informado que los cambios en el peso molecular de las proteínas y el grado de desnaturalización influyen en la  $T_g$ , debido a que la temperatura de transición vítrea oscila según la estructura primaria de las proteínas [280]. La disminución de la masa molecular de la proteína reduce la  $T_g$  debido al aumento de la movilidad molecular [281]. La estructura secundaria y terciaria de las proteínas y los pesos moleculares de las proteínas no son los únicos factores que influyen en la capacidad de procesamiento de los plásticos con base en proteínas. La degradación también cambia la estructura de la proteína.

## 5. Resultados y Discusión

El pretratamiento con ultrasonido tuvo mayor efecto en las propiedades térmicas de las proteínas de biomasa del consorcio D, en comparación con las muestras pretratadas con ozono. Lo anterior está relacionado con el hecho de que el ultrasonido puede producir cambios en las proteínas por acción térmica, química y mecánica, lo que produce un efecto sustancial en las proteínas de microalgas, mientras que el pretratamiento con ozono solo produce cambios químicos.

El efecto del pretratamiento con ultrasonido sobre la  $T_g$ ,  $T_d$  y  $\Delta H_d$  de las proteínas del consorcio S se presenta en la Tabla 26 y Figura 46. El pretratamiento con ultrasonido tuvo efectos variados en la  $T_g$ ,  $T_d$  y  $\Delta H_d$  de las proteínas del consorcio S al aumentar la energía aplicada.

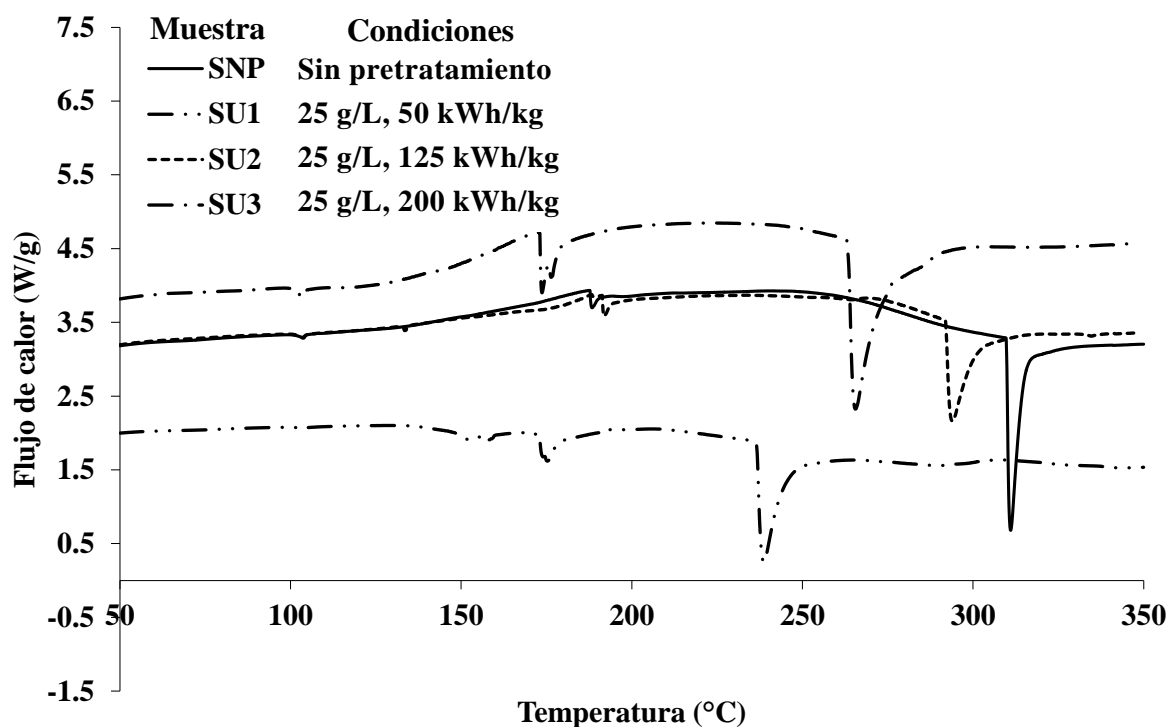
**Tabla 26.-** Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la  $T_g$ ,  $T_d$  y  $\Delta H_d$  de las proteínas de biomasa del consorcio S.

Muestras	Condiciones experimentales (a, b)	$T_g$ (°C)	$T_d$ (°C)	$\Delta H_d$ (J/g)
SU1	25 <sup>a</sup> , 50 <sup>b</sup>	173	239	50
SU2	25 <sup>a</sup> , 125 <sup>b</sup>	191	294	41 ± 1
SU3	25 <sup>a</sup> , 200 <sup>b</sup>	173	265	112

<sup>a</sup> [Biomasa] (g/L)

<sup>b</sup> Energía aplicada (kWh/kg de biomasa seca)

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.



**Figura 46.** Termogramas de DSC de proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ultrasonido.

Durante el pretratamiento con ultrasonido, la energía aplicada más alta (200 kWh/kg de biomasa seca), indujo un aumento en la  $\Delta H_d$  en 70 °C. Estos resultados con los presentados en el perfil SDS-PAGE y el análisis densitométrico indicaron que el comportamiento térmico de las proteínas cambió debido a que incremento la concentración relativa de los agregados formados [282]. El aumento de la entalpía de desnaturalización puede explicarse con la formación de

## 5. Resultados y Discusión

nuevos enlaces intermoleculares y al aumento del peso molecular de los agregados de proteínas. Como se mencionó anteriormente, las altas temperaturas dentro de la solución durante el pretratamiento pueden conducir a un despliegue inducido por la temperatura que promueve la agregación, aún con el control de temperatura [266].

El efecto del pretratamiento de ozono sobre las propiedades térmicas de las proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ozono se muestra en la Tabla 27 y la Figura 47.

**Tabla 27.-** Efecto del pretratamiento con ozono en la  $T_g$ ,  $T_d$  y  $\Delta H_d$  de las proteínas de biomasa del consorcio S.

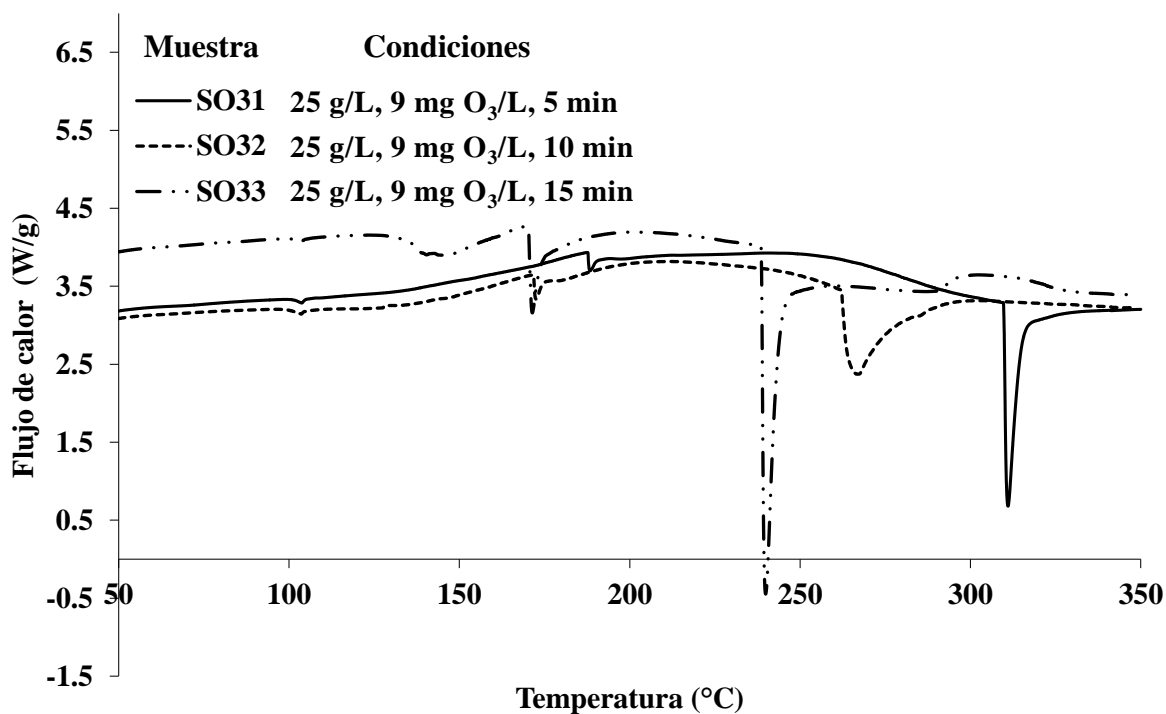
Muestra	Condiciones experimentales (a, b, c)	$T_g$ (°C)	$T_d$ (°C)	$\Delta H_d$ (J/g)
SO1	25 <sup>a</sup> , 9 <sup>b</sup> , 5 <sup>c</sup>	188	311	47
SO2	25 <sup>a</sup> , 9 <sup>b</sup> , 10 <sup>c</sup>	172	266	79 ± 1
SO3	25 <sup>a</sup> , 9 <sup>b</sup> , 15 <sup>c</sup>	170	240	83 ± 1

<sup>a</sup> [Biomasa] (g/L)

<sup>b</sup> [O<sub>3</sub>] (mg O<sub>3</sub>/L)

<sup>c</sup> Tiempo (min)

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.



**Figura 47.** Termogramas de DSC de proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ozono.

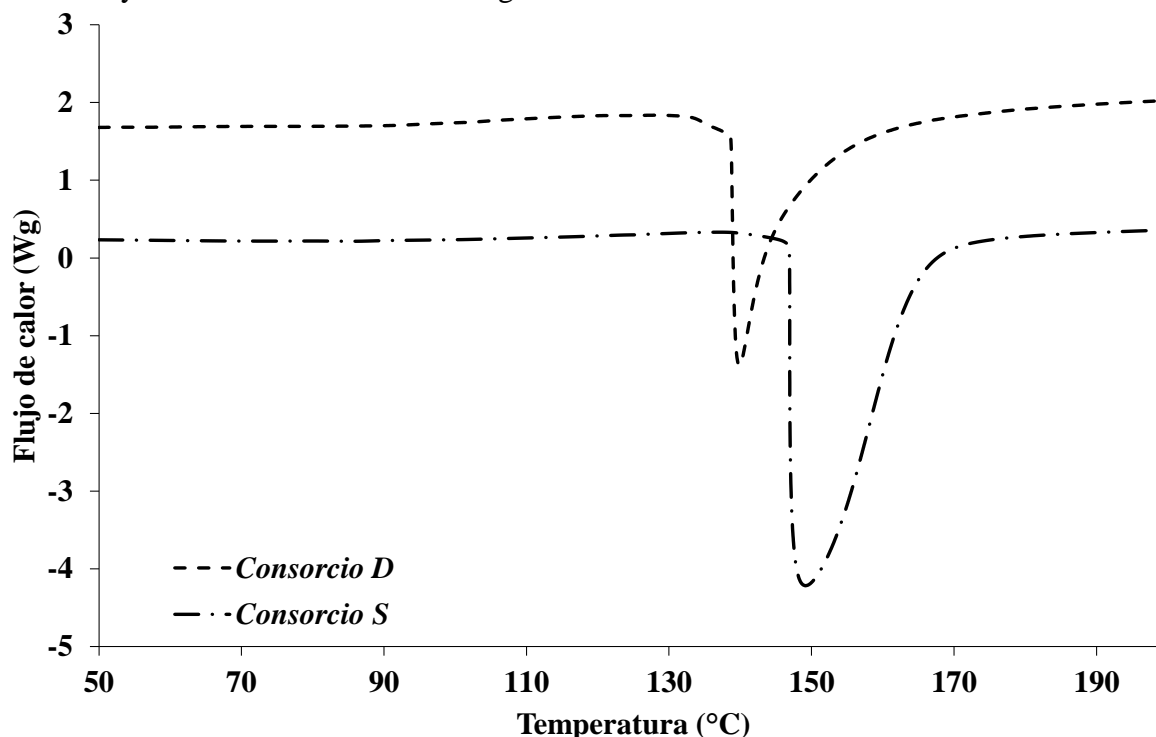
La  $T_g$  y la  $T_d$  de las proteínas de biomasa del consorcio S disminuyeron, aunque la  $\Delta H_d$  incrementó a medida que aumentó el tiempo de contacto con ozono. Como se mencionó en la sección 5.3.2, la disminución en  $T_g$  y  $T_d$  puede explicarse ya que el ozono modificó la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. Los resultados encontrados en el termograma de DSC concuerdan con los resultados encontrados en el perfil SDS-PAGE y el análisis densitométrico, que mostró la aparición de una banda a 150 kD. Esta banda incrementó en concentración relativa a medida que incremento el tiempo de contacto con ozono y se atribuye a la formación

de agregado de proteínas. El perfil también mostró una disminución en la cantidad relativa de proteínas de pesos moleculares entre 50 y 25 kD y el desvanecimiento de bandas de proteínas con pesos moleculares menores de 20 kD, a medida que aumentó el tiempo de contacto con el ozono, lo que debería haber inducido una disminución de la  $\Delta H_d$ .

### 5.4 Obtención de bioplásticos con base en biomasa de microalgas

#### 5.4.1 Caracterización térmica de biomasa de microalgas

Los termogramas de DSC de la biomasa de los consorcios D y S en un rango de temperatura entre 0 °C y 200 °C se muestran en la Figura 48.



**Figura 48.** Termogramas de DSC de biomasa de los consorcios D y S.

Para ambos tipos de biomasa solo se observa un evento endotérmico. El pico endotérmico corresponde a la temperatura de desnaturalización de las proteínas presentes en la biomasa. Aunque los termogramas no proporcionan mucha información para poder elegir las condiciones a las cuales se puede procesar el bioplástico, nos da un límite de temperatura a la cual se puede trabajar. En el caso de biomasa del consorcio D la máxima temperatura de trabajo es 139.89 °C, mientras que para biomasa del consorcio S, la máxima temperatura de trabajo es 149.14 °C.

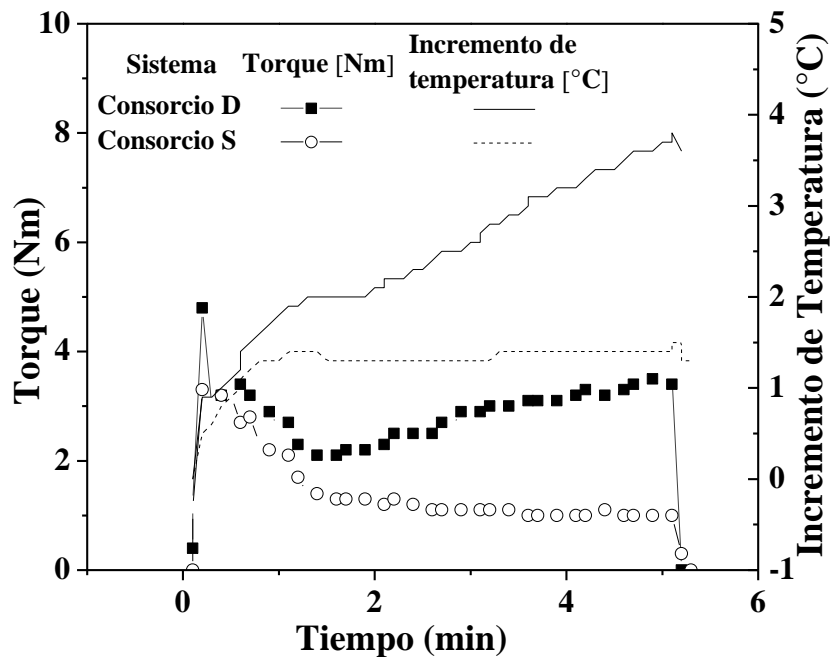
#### 5.4.2 Obtención de las mezclas biomasa/glicerol (60/40) mediante mezclado termoplástico

La selección adecuada de las condiciones de mezclado para la obtención de una masa que se pueda moldear es de suma importancia. Por un lado, se requiere un tiempo de mezclado extenso para obtener una masa homogénea. Por otro lado, se deben evitar períodos de mezcla excesivamente largos, para limitar la estructura inducida por el esfuerzo de corte aplicado [283]. Por lo tanto, para guiar la selección de las condiciones de moldeo por inyección, se monitorearon los valores de torque e incremento de temperatura durante el proceso de mezclado. La Figura 49 muestra el torque y el incremento de temperatura en función del tiempo de mezclado. El glicerol fue elegido como plastificante, ya que es uno de los plastificantes más económicos, se puede obtener a través de recursos biológicos y es biodegradable, el sistema biomasa/glicerol elegido fue 60/40. Se puede observar que los sistemas de biomasa de ambos consorcios evolucionaron rápidamente hacia valores constantes de bajo torque, lo cual es típico



## 5. Resultados y Discusión

del comportamiento líquido de una mezcla moderadamente viscosa, que resulta fácilmente inyectable; este sistema permanece en un valor de par moderado. En el caso de la biomasa del consorcio S, los cambios de temperatura durante el proceso de mezclado siguen un patrón muy similar al perfil de par correspondiente, y, por lo tanto, indica que existe disipación de energía mecánica, aunque también pueden ocurrir algunas reacciones de reticulación exotérmica de cadenas de proteínas. Esto no resulta extraño ya que, como se vio con anterioridad, las proteínas presentes en esta biomasa, en general, tienden a la formación de agregados [284]. Por otra parte la pared celular de ambos tipos de biomasa puede también tener un efecto importante e inducir la reticulación de proteínas de biomasa del consorcio D. En este punto, debemos enfatizar la importancia de evitar condiciones que den lugar a una reticulación inducida por cizallamiento durante la mezcla. Esta es la razón por la cual se seleccionó un tiempo de mezcla de tan solo 5 minutos para la preparación de mezclas. De esta manera, todo el potencial de reticulación para la formación de estructuras y el refuerzo puede explotarse durante el proceso de inyección.



**Figura 49.** Evolución del torque e incremento de temperatura durante el proceso de mezclado de los sistemas biomasa/glicerol.

### 5.4.3 Caracterización térmica de las mezclas

La Tabla 28 muestra el módulo elástico ( $G'$ ), módulo viscoso ( $G''$ ) y la tangente de pérdida ( $\tan \delta$ ) obtenidos de mediciones de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud para las mezclas biomasa/glicerol (60/40) como función de la temperatura. Los módulos elásticos obtenidos ( $G'$ ) siempre estuvieron por arriba de los módulos viscosos ( $G''$ ), dentro del rango completo de temperaturas estudiado, lo que indica que las mezclas tenían, un comportamiento predominantemente elástico. El objetivo de estas mediciones fue determinar los procesos que se llevan a cabo durante el moldeo de los bioplásticos a las temperaturas de molde elegidas (80, 100 y 120 °C). Con la misma información se determinó la temperatura en el cilindro de preinyección, para lograr propiedades reológicas que permitan mantener una viscosidad moderada, lo que facilita la inyección en el molde y evita usar una temperatura demasiado alta que conlleva el riesgo de reticulación entre los segmentos de proteínas en el cilindro. Esto hace posible obtener bioplásticos con mayor reproducibilidad y eficiencia. En el caso de la biomasa del consorcio D se observa un incremento para ambos módulos, elástico y viscoso, y la tangente de pérdida cuando la temperatura de molde se incrementa de 80 a 100 °C, con el siguiente aumento de temperatura ambos módulos y la tangente de pérdida disminuyeron. Este

## 5. Resultados y Discusión

comportamiento puede explicarse en términos de una mejora de la estructura de la red, relacionada con la aparición de reticulación de proteínas inducida térmicamente cuando la temperatura de molde incrementa de 80 a 100 °C, esto es favorable ya que este es el proceso deseado durante el moldeo. El decremento de los módulos elástico y viscoso a la temperatura de molde más alta (120 °C) está asociado al aumento de la movilidad de las cadenas poliméricas debido a la rotura de puentes de hidrogeno. Es probable que a partir de la rotura de estos enlaces se generen nuevas interacciones que mejoren la calidad del bioplástico [154]. Para las tres temperaturas de trabajo estudiadas, la tangente de pérdida permanece muy por debajo de 1 lo que refleja el carácter predominantemente elástico de estas mezclas durante la etapa de moldeo.

**Tabla 28.**- Modulo elástico (G'), módulo viscoso (G'') y tangente de pérdida ( $\delta$ ) a 1 Hz y 5 °C/min como función de la temperatura para las mezclas de biomasa de los consorcios D o S/glicerol (60/40).

Biomasa	Temperatura	G' (Pa)	G'' (Pa)	tan ( $\delta$ )
<b>Consorcio D</b>	25 °C	$2 \times 10^5$	$4.84 \times 10^4$	0.242
	80 °C	$1.5 \times 10^6$	$4.31 \times 10^5$	0.288
	100 °C	$1.78 \times 10^6$	$5.43 \times 10^6$	0.305
	120 °C	$1.35 \times 10^6$	$3.51 \times 10^5$	0.260
<b>Consorcio S</b>	25 °C	$3.7 \times 10^5$	$1.08 \times 10^5$	0.284
	80 °C	$1.07 \times 10^5$	$3.46 \times 10^4$	0.323
	100 °C	$9.48 \times 10^5$	$2.33 \times 10^5$	0.246
	120 °C	$9.04 \times 10^5$	$2.23 \times 10^5$	0.246

En el caso de la biomasa del consorcio S ambos módulos aumentaron con el aumento de la temperatura de molde, Tabla 28. El incremento de los módulos elástico y viscoso durante el proceso de moldeo infiere un aumento de reticulación entre las proteínas, lo cual puede mejorar las propiedades mecánicas del bioplástico. Para las mezclas de biomasa del consorcio S a las tres temperaturas de moldeo estudiadas, la tangente de pérdida permanece muy por debajo de 1 reflejando el carácter predominantemente elástico de las mezclas.

### 5.4.4 Proceso de moldeo por inyección

Los parámetros de procesamiento para el cilindro de preinyección se seleccionan con la finalidad de facilitar el proceso de inyección lo que mejora la movilidad del sistema en el cilindro. Teniendo en cuenta la  $T_g$  que se obtuvo en las secciones anteriores las condiciones de operación para el moldeo por inyección se muestran en la Tabla 29.

**Tabla 29.** Condiciones de operación para el moldeo por inyección de las masas biomasa de microalgas/glicerol (60/40).

Etapa	T °C	Presión (MPa)	Tiempo (seg)
<b>Cilindro de pre-inyección</b>	60 °C	0.1	120
<b>Inyección</b>	60 °C	50	20
<b>Etapa de moldeo</b>	80, 100 y 120 °C	20	200

5.4.5 Caracterización reológica de los bioplásticos

La Tabla 30 muestra la evolución de los módulos elástico y viscoso ( $G'$  y  $G''$ , respectivamente) como función de la frecuencia para los bioplásticos moldeados a tres diferentes temperaturas (80, 100 y 120 °C) obtenidos a partir de mediciones de pequeña amplitud oscilatoria (SAOS). Los módulos elásticos ( $G'$ ) siempre estuvieron por arriba de los módulos viscosos ( $G''$ ) dentro del rango completo de frecuencias estudiado, lo que indica que estos materiales tenían un comportamiento predominantemente elástico. Además,  $G'$  es casi paralela a  $G''$ , lo que sugiere que, a temperatura ambiente, no podría observarse un punto de cruce [285]. En el caso de los bioplásticos con base en biomasa del consorcio D un aumento en la temperatura de molde indujo el incremento de los módulos viscoelásticos. Además, la tangente de pérdida promedio ( $\tan \delta = G''/ G'$ ) disminuyó de  $0.245 \pm 0.02$  a  $0.234 \pm 0.03$  al aumentar la temperatura de molde de 80 a 120 °C, revelando un fortalecimiento de la estructura a medida que aumentaba la temperatura de molde. Estos resultados a menudo son relacionados con la existencia de un potencial termoestable de las matrices de proteína, siempre y cuando la temperatura de molde sea inferior a la temperatura de degradación del sistema de proteínas [284, 286, 287].

**Tabla 30.** Modulo elástico ( $G'$ ), módulo viscoso ( $G''$ ) y tangente de pérdida ( $\delta$ ) a 1 Hz, como función de la frecuencia para las mezclas de biomasa de los consorcios D o S/glicerol (60/40).

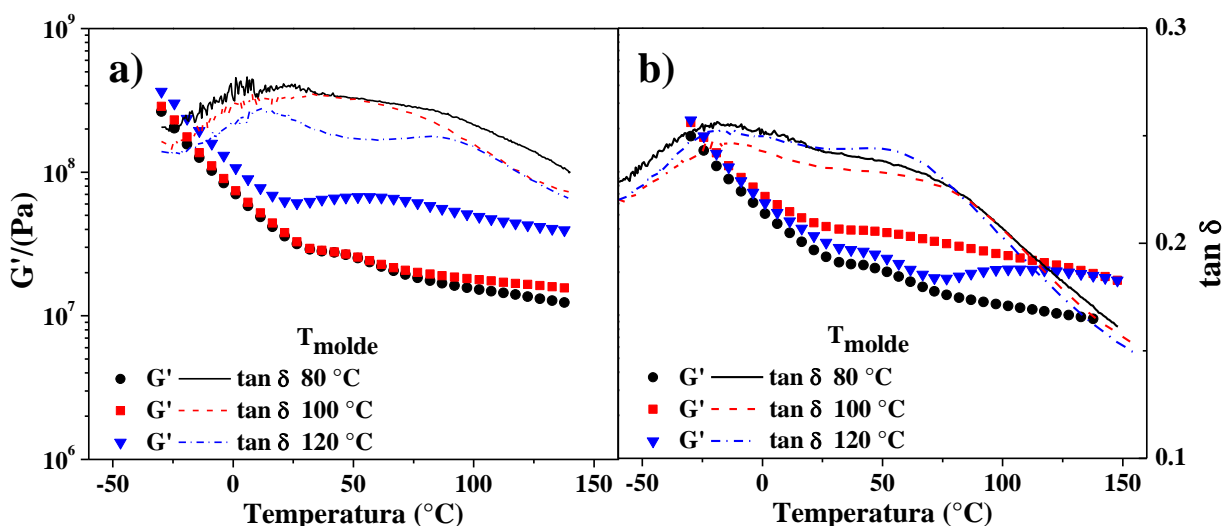
Biomasa	Temperatura de molde	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$\tan (\delta)$
Consortio D	80 °C	$3.57 \times 10^7$	$8.75 \times 10^6$	0.245
	100 °C	$3.79 \times 10^7$	$8.90 \times 10^6$	0.235
	120 °C	$5.92 \times 10^7$	$1.39 \times 10^7$	0.234
Consortio S	80 °C	$2.01 \times 10^7$	$4.76 \times 10^7$	0.237
	100 °C	$3.39 \times 10^7$	$7.44 \times 10^6$	0.219
	120 °C	$3.18 \times 10^7$	$7.61 \times 10^6$	0.239

Por otro lado, para las probetas que se obtienen a partir de biomasa del consorcio S, el modulo elástico aumentó con un aumento de temperatura de 80 a 100 °C y se mantiene prácticamente estable con el posterior aumento de temperatura. Mientras que el módulo viscoso y la tangente de pérdida disminuyen con el primer aumento de temperatura (80 a 100 °C) y aumentan con el siguiente aumento de temperatura (100 a 120 °C). El módulo viscoso incremento muy ligeramente mientras que la tangente de pérdida alcanzó un valor mayor al alcanzado a 80 °C. Esto indica que, a la temperatura de molde de 100 °C, se obtiene un material menos deformable, debido al fortalecimiento de su estructura con el aumento de temperatura. Por otra parte es posible que a la temperatura de molde más alta (120 °C) las proteínas sufran algún cambio en su estructura lo que provoca que las propiedades viscoelásticas del bioplástico disminuyan. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis térmico de las proteínas de cada tipo de biomasa, donde se observa que las proteínas de biomasa del consorcio D son más estables térmicamente en un rango de 60 °C, en comparación con las proteínas de biomasa del consorcio S.

## 5.4.6 Análisis térmico-mecánico-dinámico

La Figura 50 muestra el módulo elástico ( $G'$ ) y la tangente de pérdida ( $\delta$ ) en función de la temperatura, para los bioplásticos con base en biomasa de a) consorcio D y b) consorcio S. Ambos sistemas exhiben el mismo comportamiento, donde el componente elástico ( $G'$ ) se mantuvo por arriba del viscoso ( $G''$ ), como puede deducirse de los valores de tangente, ambos módulos disminuyen notablemente con la temperatura. Para todos los sistemas obtenidos el perfil térmico de  $G'$  pasa a través de un punto de inflexión, que puede estar relacionado con una transición vítrea, y tiende a alcanzar una región de meseta conforme aumenta la temperatura de molde. Esta región de meseta indica que no se encuentra potencial termoestable bajo las condiciones experimentales seleccionadas, lo que evidencia que no se requieren temperaturas de molde más altas y tiempos de residencia más largos.

En el caso de bioplásticos con base en biomasa del consorcio D los valores de  $G'$  son más altos para la muestra moldeada a 120 °C, lo que indica una respuesta más elástica, debido a formación de interacciones de tipo hidrofóbicas y disulfuro que son más estables con la temperatura. En el caso de bioplásticos con base en el consorcio S, la muestra moldeada a 100 °C es la que indica una respuesta más elástica, por lo tanto se puede concluir que a la temperatura de molde más alta (120 °C) las proteínas del consorcio S sufren un proceso de degradación, por lo tanto, disminuyen sus propiedades viscoelásticas. Por otra parte, el perfil de la tangente de pérdida muestra un pico para todos los bioplásticos obtenidos, lo que revela que existió buena compatibilidad entre la proteína y el glicerol.



**Figura 50.** Valores de módulo elástico ( $G'$ ) y tangente de pérdida ( $\delta$ ) en función de la temperatura del análisis térmico-mecánico-dinámico llevado a cabo a frecuencia constante (1 Hz) y velocidad de calentamiento (3 °C/min).

Las proteínas del consorcio D condujeron a la formación de bioplásticos con mejores propiedades viscoelásticas. Esto se puede deber a que son más estables térmicamente en comparación con las proteínas del consorcio S lo que evita su descomposición durante el proceso de obtención de bioplásticos. Por lo tanto, es posible que los bioplásticos con base en biomasa del consorcio D muestren mejores propiedades mecánicas.

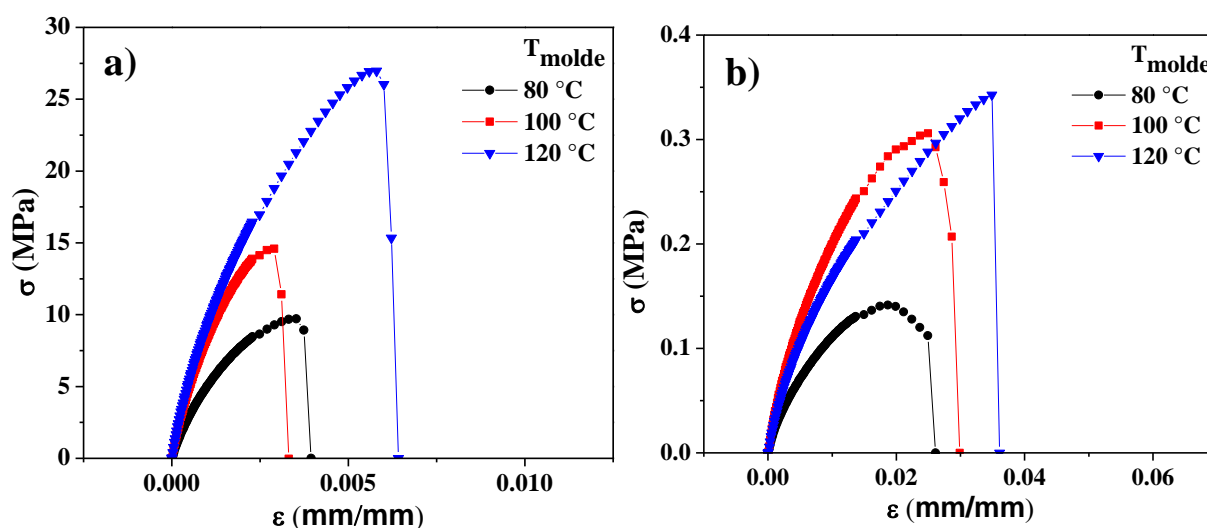
## 5.4.7 Mediciones de resistencia a la tracción

Las curvas de tensión-deformación que se obtuvieron de las medidas de resistencia uniaxiales para ambos sistemas siguen el patrón típico encontrado para otros materiales bioplásticos con base en proteínas, Figura 51. Todas las curvas tienen una región lineal inicial, con una constante pendiente de tensión-deformación (que corresponde al módulo elástico o al Módulo de Young)

## 5. Resultados y Discusión

debido a una buena resistencia a bajos valores de deformación. Luego, hay una larga región plástica, con una disminución continua en la pendiente de tensión-deformación hacia un valor constante; después del límite elástico, se alcanza el esfuerzo máximo ( $\sigma_{\max}$ ) y la deformación a la rotura ( $\epsilon_r$ ), lo que conlleva a la ruptura de la muestra. En ese punto hay una disminución repentina de la tensión.

Las curvas de tensión-deformación indicaron que el aumento de la temperatura de molde induce un aumento en  $\sigma_{\max}$  y  $\epsilon_r$ . Esto fue más evidente para los bioplásticos con base en biomasa del consorcio D, Tabla 31. Este resultado concuerda con la mejora del módulo elástico de las probetas a medida que aumenta la temperatura de molde, tal como se muestra en la sección 5.4.5. Es interesante notar que este aumento en  $\sigma_{\max}$  fue acompañado de un aumento en  $\epsilon_r$ , lo que sugiere que este resultado probablemente está relacionado con la formación de reticulación de las proteínas a altas temperaturas [288].



**Figura 51.** Curvas de tensión-deformación para los bioplásticos con base en biomasa de a) consorcio D y b) consorcio S/glicerol molde (80, 100 y 120 °C).

Los resultados obtenidos de las curvas de tensión-deformación, así como los resultados presentados anteriormente, indicaron que el tratamiento que sufren las proteínas dentro del molde pueden modificar las proteínas llevándolas de su forma nativa a un estado desnaturalizado. Este estado desnaturalizado puede llevar a la agregación de proteínas y pueden ocurrir interacciones intermoleculares [289, 290]. Además de las interacciones químicas promovidas por el calor, los tratamientos térmicos a las temperaturas más altas (120 °C) pueden llevar a la formación de entrecruzamientos intermoleculares e incluso intramoleculares [291]. Sin embargo, como se puede notar, esos parámetros no fueron similares para los bioplásticos de ambos tipos de biomasa.

Los bioplásticos que se obtienen con base en biomasa del consorcio D tuvieron valores de esfuerzo máximo del orden de dos magnitudes mayor a los presentados por los bioplásticos con base en biomasa del consorcio S. En el caso de deformación a la rotura los bioplásticos con base en biomasa del consorcio S presentaron valores del orden de una magnitud mayor que los bioplásticos con base en biomasa del consorcio D. Estos efectos se pueden deber a que las interacciones que se dan entre proteínas de biomasa del consorcio D son fuertes ya que tienen una alta resistencia a la tensión. No obstante, esta misma cualidad los vuelve poco elásticos. Este mismo efecto se observa en los módulos viscoelásticos para las probetas con base en biomasa del consorcio D que se muestran en la Tabla 30. El módulo elástico tuvo un ligero incremento cuando incrementó la temperatura de molde, mientras que el módulo viscoso

## 5. Resultados y Discusión

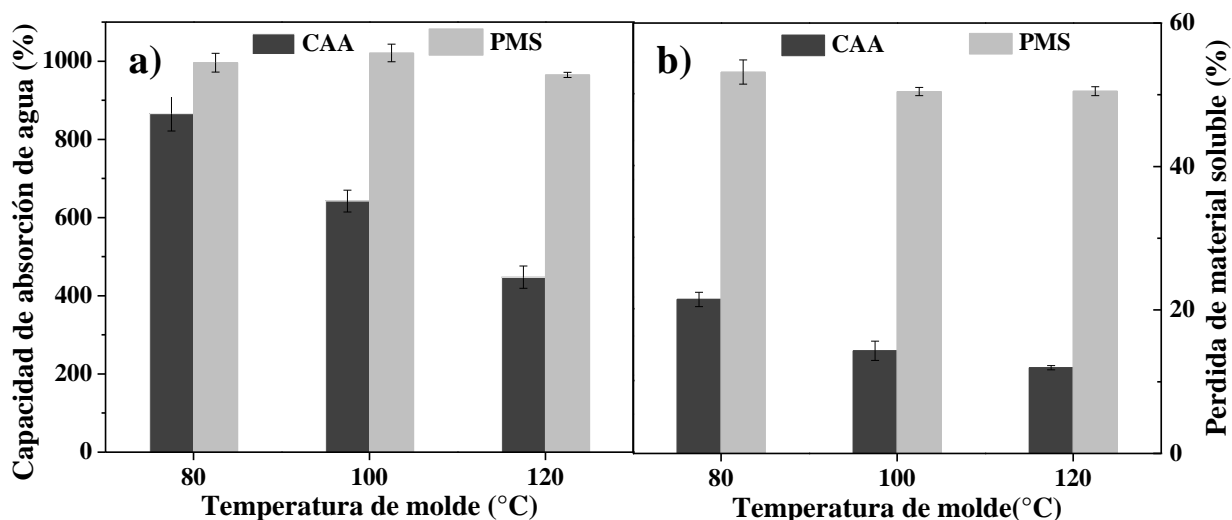
aumentó en una magnitud. Otra posible causa de estos resultados es la pared celular de las células del consorcio D en comparación con la pared celular de las microalgas del consorcio S, ya que presenta una pared más de esporopolelina, lo que probablemente evita que se lleven a cabo interacciones entre proteínas promovidas por el calor, como resultado se obtienen materiales poco elásticos. Por otra parte las proteínas del consorcio S tienden a formar agregados, esto puede evitar potencialmente la formación de entrecruzamientos promovidos por el calor.

**Tabla 31.** Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo ( $\sigma_{\max}$ ) y deformación a la rotura ( $\epsilon_r$ ) para los bioplásticos con base en proteínas de biomasa de los consorcios D y S.

Biomasa	Temperatura de molde	Módulo de Young (MPa)	$\sigma_{\max}$ (MPa)	$\epsilon_r$ (%)
Consortio D	80 °C	198.27 ± 6.28	9.48 ± 0.90	0.331 ± 0.02
	100 °C	112.78 ± 3.48	15.8 ± 1.6	0.276 ± 0.01
	120 °C	100.67 ± 10.63	28.75 ± 2.35	0.563 ± 0.07
Consortio S	80 °C	11.60 ± 0.60	0.14 ± 0.015	0.33 ± 0.02
	100 °C	24.18 ± 2.55	0.33 ± 0.032	3.20 ± 0.34
	120 °C	21.22 ± 1.91	0.35 ± 0.087	4.81 ± 0.21

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones al menos por triplicado.

### 5.4.8 Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble



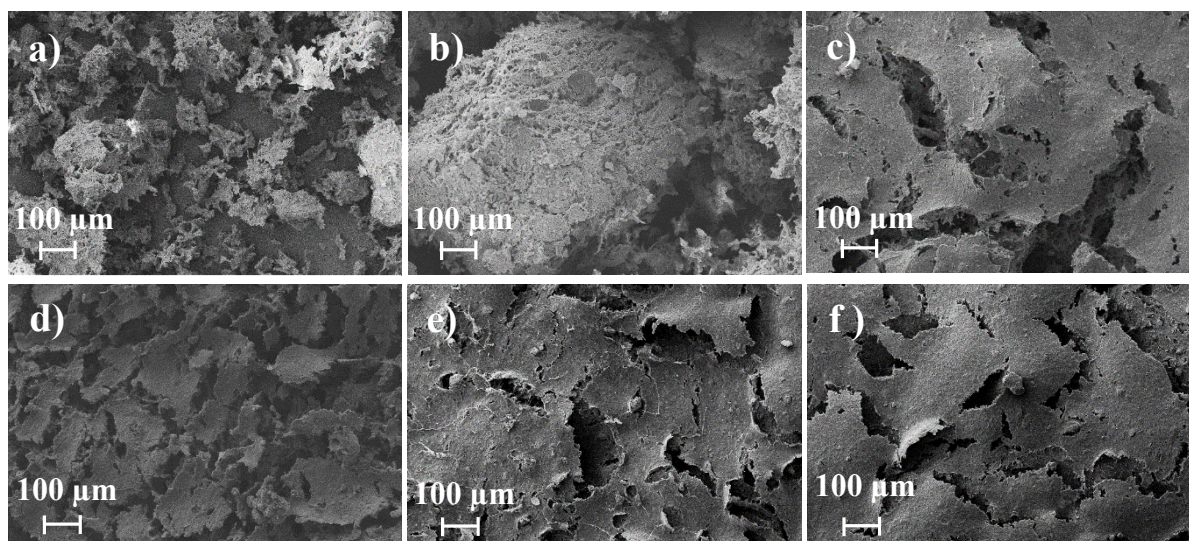
**Figura 52.** Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble después de 24 h de inmersión, para los bioplásticos con base en proteínas de biomasa de a) consorcio D y b) consorcio S.

La Figura 52 exhibe los valores para las capacidades de absorción de agua y pérdida de material soluble obtenidos para todos los materiales con base en biomasa de microalgas estudiados después de 24 h de inmersión en agua. La capacidad de absorción de agua disminuye para todos los sistemas de proteínas estudiados con el aumento de la temperatura de molde. Este resultado se puede explicar con el aumento del entrecruzamiento entre las moléculas de proteína a medida que aumenta la temperatura de molde, ya que evita que las probetas se hinchen. Por otro lado,

## 5. Resultados y Discusión

las probetas que se obtuvieron con base en biomasa del consorcio S presentaron menor capacidad de absorción de agua que las probetas que se obtuvieron con base en biomasa del consorcio D. Con estos resultados se puede concluir que hubo mayor entrecruzamiento de proteínas en las probetas con base en biomasa del consorcio S que en las probetas con base en biomasa del consorcio D, como resultado de la pared celular de las microalgas. Como se mencionó en la sección 5.4.6, las células de *Desmodesmus sp.* presentan una pared celular más rígida que las células de *Scenedesmus obliquus*. Por lo tanto, los bioplásticos con base en biomasa del consorcio S presentan una estructura más rígida en comparación con los materiales que se obtienen con base en biomasa del consorcio D. Esto resulta en una menor capacidad de hinchamiento, que siempre es directamente proporcional a su capacidad de absorción de agua.

Por otro lado, aunque la pérdida de material soluble parece estar alrededor del 50% en peso en todos los casos, el aumento de la temperatura del molde conduce a una ligera disminución en este valor, Figura 53. El aumento en el entrecruzamiento de las proteínas con el aumento de la temperatura de molde, debería conducir a una mayor disminución en la pérdida de material soluble. Sin embargo, no se debe olvidar que la mezcla biomasa/plastificante tenía una relación 60/40. Por lo tanto, es posible concluir que la mayor parte del material que se perdió en el agua fue el plastificante y que solo una proporción conduce a la pérdida de proteínas. Esto se debe, en el caso de materiales con base en biomasa del consorcio D, a la rígida pared celular. En el caso de los materiales con base en biomasa del consorcio S a la alta reticulación de proteínas.



**Figura 53.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) para los bioplásticos con base en biomasa del consorcio D a tres temperaturas de molde a) 80, b) 100 y c) 120 °C y con base en biomasa del consorcio S a tres temperaturas de molde d) 80, e) 100 y f) 120 °C después de 24 h de inmersión en agua.

En la Tabla 32 muestra la comparación de las propiedades mecánicas de bioplásticos con base en concentrados de proteínas de origen alimenticio y biomasa de microalgas de diferentes especies con este estudio. Los resultados muestran que los materiales que se obtienen con base en concentrados de proteína de origen alimenticio muestran mejores propiedades viscoelásticas en comparación con los que se obtienen con base en microalgas de ambos tipos de biomasa. Sin embargo, el bioplástico que presentó mayor resistencia a la tracción fue el que se obtuvo con base en biomasa del consorcio D esto le puede atribuir al bioplástico importantes aplicaciones. Aunado a esto el potencial de obtención de bioplásticos con base en biomasa del consorcio D se incrementa ya que el contenido de proteína es de tan solo 31%. Además, debido a la naturaleza del medio de cultivo en el que se obtiene la biomasa de microalgas la obtención de bioplásticos con base en esta biomasa no compete con su aplicación en el rubro alimenticio.

---

## 5. Resultados y Discusión

---

Los bioplásticos que se obtienen en este trabajo de tesis tienen aplicaciones limitadas. No obstante, existen importantes áreas en las que se pueden aplicar. Una de estas áreas es su aplicación como materiales absorbentes de agua y fertilizantes disueltos, que puedan ser utilizados posteriormente para la adición de fertilizantes durante el proceso de cultivo de alimentos. Este método de adición de fertilizantes al suelo es un candidato rentable y amigable con el ambiente, ya que protege el suelo y el agua. Además la biomasa de microalgas es biodegradable y puede nutrir al suelo a largo plazo debido a su contenido de proteínas y fósforo. La remediación de suelo mediante la adición de microalgas también ha sido estudiada recientemente con resultados alentadores.

Por otra parte, los materiales pueden ser ampliamente utilizados en el tratamiento de aguas residuales, debido a sus atractivas propiedades absorbentes, bajo costo y seguridad ambiental. Además, la biomasa de microalgas es biodegradable y contiene abundantes grupos funcionales en su estructura, que pueden proporcionar sitios activos para capturar iones de metales pesados. La aplicación de estos adsorbentes, despierta considerablemente la atención ya que mantienen su estructura después de su inmersión en agua lo que promueve su fácil separación del agua a tratar. No obstante, la estructura de los bioplásticos es especialmente susceptible a daños en soluciones ácidas.



## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 32.** Comparación de casos de estudio de obtención de bioplásticos con base en proteína.

Mezcla	Método de preparación	Contenido de proteína (%)	Máximo esfuerzo (MPa)	Deformación a la rotura (%)	Módulo de Young (MPa)	Referencia
<b>70% Proteína de chícharo/30% Glicerol</b>	Moldeo por inyección	89.5	5	50	180	[292]
<b>70% Proteína de arroz/30% Glicerol</b>	Moldeo por inyección	80	4	0.11	90	[287]
<b>60% Albumina de huevo/40% Glicerol</b>	Moldeo por inyección	83	1.7	60	37	[286]
<b>60% Proteína de soya/40% Glicerol</b>	Moldeo por inyección	91	1.2	40	25	[286]
<b>30% Albumina de huevo/30% Proteína de soya/40% Glicerol</b>	Moldeo por inyección	83/91	1.4	75	30	[286]
<i>Spirulina plantesis</i>	Moldeo termomecánico	57	3	1.4	249	[293]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Moldeo termomecánico	58	5.7	3.4	270	[293]
<b>Consorcio D/Glicerol</b>	Moldeo por inyección	31	28.8	0.56	101	<b>Este estudio</b>
<b>Consorcio S/Glicerol</b>	Moldeo por inyección	22	0.35	4.8	21	<b>Este estudio</b>

## 5. Resultados y Discusión

### 5.5 Obtención de biocompositos con base en PCL y biomasa residual de microalgas de los consorcios D y S

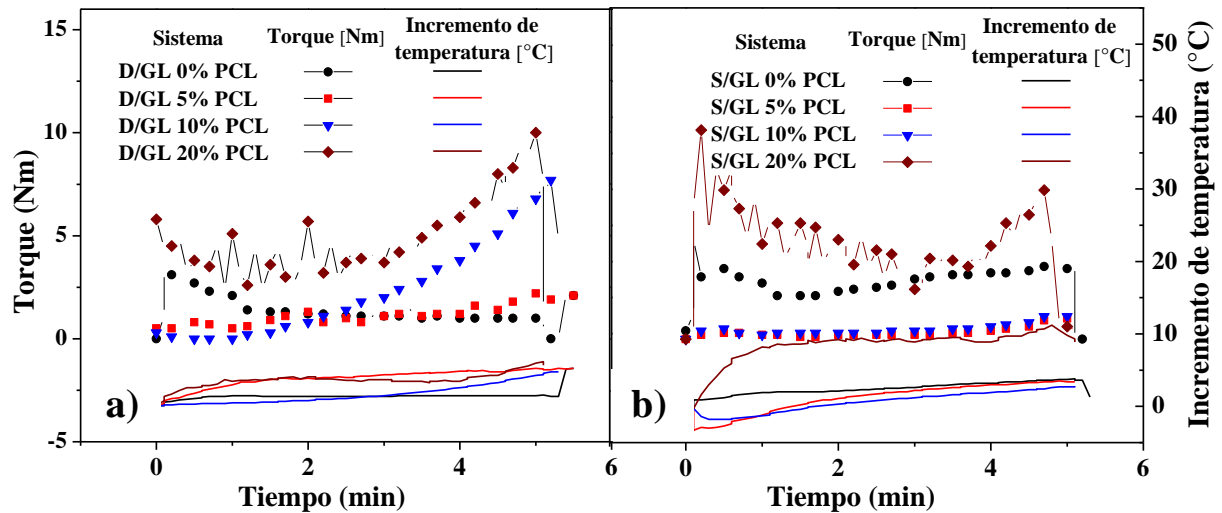
#### 5.5.1 Caracterización de biomasa residual

La biomasa que se utilizó como materia prima para la obtención de biocompositos se obtuvo después del pretratamiento de la biomasa con ultrasonido u ozono y la extracción de proteínas. Por lo tanto fue necesario llevar a cabo su completa caracterización. El contenido de lípidos, proteínas, carbohidratos, humedad y cenizas, de la biomasa residual se muestra en la Tabla 33.

**Tabla 33.** Composición de la biomasa residual de los consorcios D y S utilizada para la producción de biocompositos.

Biomasa	Humedad	Lípidos	Proteínas Carbohidratos Cenizas		
			(%)		
Consortio D	15.02 ± 0.30	11.22 ± 0.39	25.95 ± 0.52	14.32 ± 0.86	28.83 ± 0.11
Consortio S	9.58 ± 0.62	7.37 ± 0.95	28.50 ± 0.84	11.29 ± 0.34	36.33 ± 0.20

#### 5.5.2 Obtención de las mezclas biomasa/GL/PCL mediante mezclado termoplástico

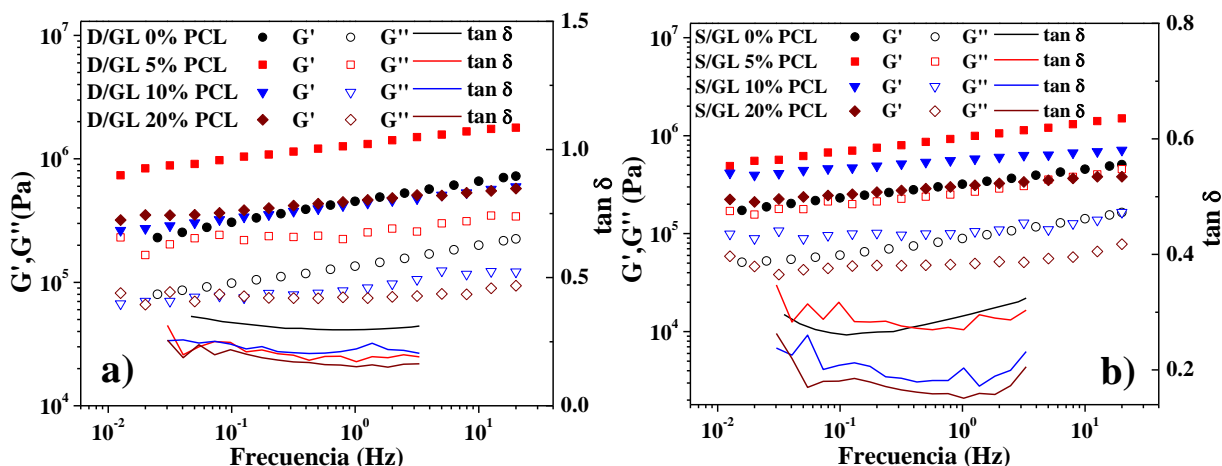


**Figura 54.** Perfiles del incremento de temperatura y torque obtenidos sobre el tiempo de mezclado para las mezclas (biomasa/GL/PCL) con base en biomasa de a) consorcio D y b) consorcio S como función de la concentración de PCL (0%, 5%, 10% y 20%).

La Figura 54 muestra los perfiles de incremento de temperatura y torque obtenidos sobre el tiempo de mezclado (5 min) para materiales biocompuestos con base en biomasa de microalgas que contienen 0, 5, 10 y 20% en peso de PCL. La primera etapa de mezclado se realizó precalentando la cámara de mezclado a 60 °C, para facilitar la fusión del PCL ( $T_f$  de PCL 60 °C) [293]. Esta etapa de pre-acondicionamiento ayudó en la producción de mezclas homogéneas. Como se puede observar para ambos tipos de biomasa, los sistemas que contienen PCL se caracterizaron por un valor de torque máximo inicial, que se relaciona con la homogeneización inicial de las mezclas [286]. Una vez que se alcanza este primer valor máximo, el torque disminuyó abruptamente a medida que aumentó la concentración de PCL en la mezcla, alcanzando un mínimo. Posteriormente, el par de torsión comenzó a incrementar nuevamente hasta que alcanzó un valor máximo. El aumento en el esfuerzo de torsión está relacionado con la reticulación entre diferentes cadenas de proteínas inducidas por cizallamiento [294, 295, 284]. El valor máximo de par de torsión fue evidentemente influenciado por el contenido de PCL. Las mezclas que contienen un mayor contenido de PCL condujeron a un valor de torque más alto. Como el PCL estaba fundido, se puede sugerir que

## 5. Resultados y Discusión

jugó un papel clave en las matrices obtenidas, ya que interactúa con otras cadenas de proteínas. Por consiguiente se espera que las propiedades mecánicas de estos materiales sean altamente influenciado por la adición de PCL. Por otra parte, la adición de PCL a la muestra indujo un ligero incremento en la temperatura de la mezcla durante el proceso de mezclado. Los perfiles de temperatura mostraron valores debajo de 80 °C en todos los casos. El aumento en la temperatura es relacionado con reacciones de reticulación exotérmicas, así como disipación de calor debido a la fricción.



**Figura 55.** Pruebas de barrido de frecuencia dinámica para las mezclas (biomasa/GL/PCL) de biomasa de a) consorcio D y b) consorcio S realizados en función de la frecuencia (de 0.05 a 20 Hz). El recuadro muestra la evolución del módulo elástico, viscoso y  $\tan \delta$  como función del contenido de PCL.

La Figura 55 muestra el aumento de los módulos viscoso y elástico con la adición de PCL (5%) a la mezcla biomasa/glicerol para ambos tipos de biomasa. Sin embargo, con el aumento de la concentración de PCL (10-20%) disminuyen nuevamente. El aumento en los módulos viscoso y elástico de las mezclas (biomasa/GL/PCL) a una concentración de PCL de 5%, indica la obtención de una mezcla con mejores propiedades para ser inyectada. Las gráficas de ambos módulos eran casi paralelos, lo que confirmó la compatibilidad de los polímeros sintético y natural. Los valores de los módulos viscoso y elástico fueron más bajos a medida que aumenta la concentración de PCL; este resultado está relacionado con el comportamiento sólido más pronunciado de las mezclas y, por lo tanto, más difíciles de inyectar [296]. Por otra parte, los valores de la tangente mostraron que los componentes de la mezcla (biomasa/GL/PCL) se encontraban totalmente integrados, ya que no se observó ningún cambio importante.

### 5.5.3 Proceso de moldeo por inyección

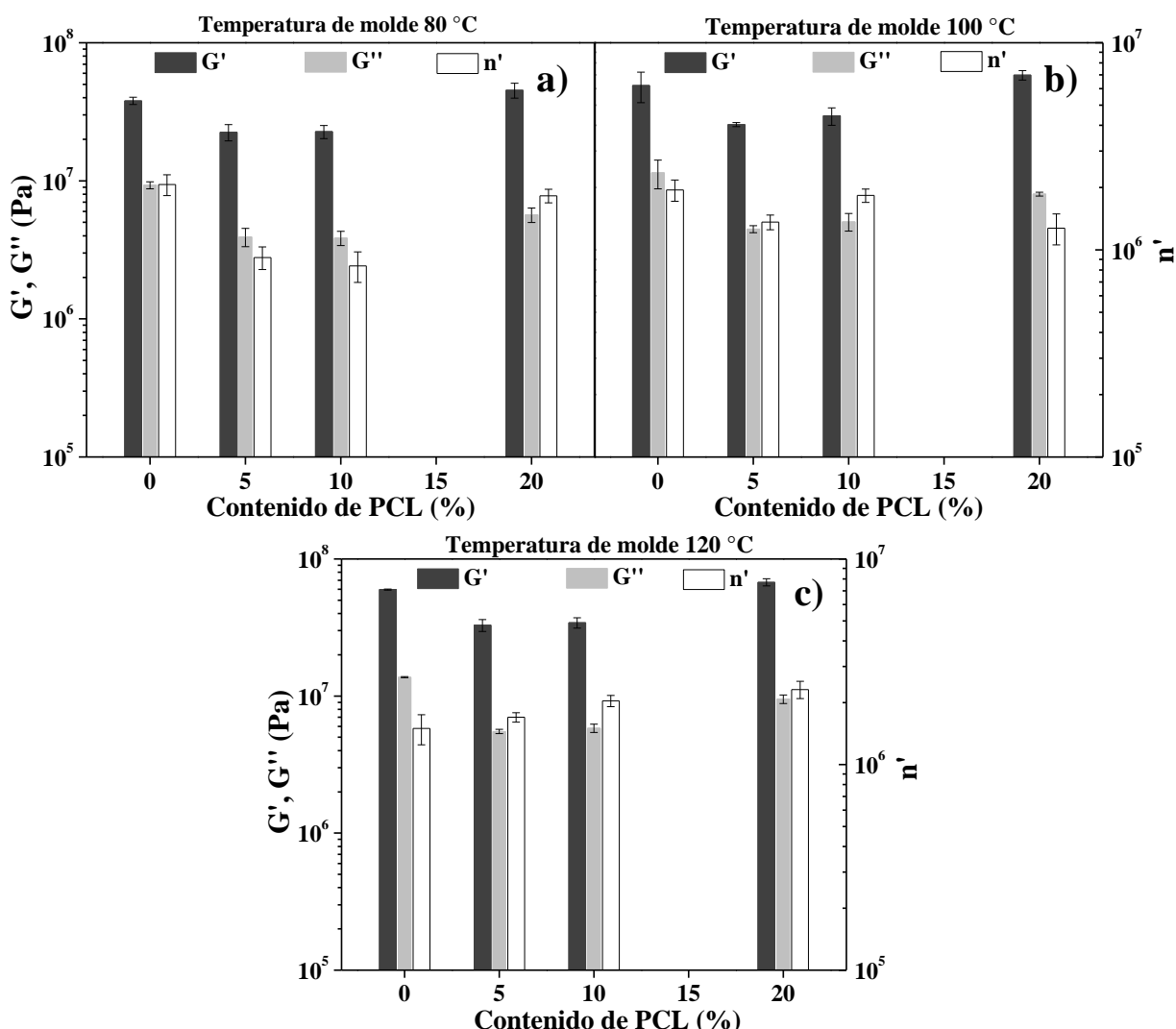
Los parámetros de procesamiento para el cilindro de preinyección se seleccionaron para facilitar la inyección en el interior, lo que mejora la movilidad del sistema, teniendo en cuenta la  $T_g$  que se obtuvo en las secciones anteriores y la temperatura de fusión del PCL. Las condiciones de operación para el moldeo por inyección de biocompositos se muestran en la Tabla 34.

**Tabla 34.** Condiciones de operación para el moldeo por inyección de biocompositos con base en biomasa de microalgas.

Etapa	T °C	Presión (MPa)	Tiempo (seg)
Cilindro de pre-inyección	70 °C	0.1	120
Inyección	70 °C	50	20
Etapa de moldeo	80, 100 y 120 °C	20	200

## 5.5.4 Caracterización reológica de biocompositos

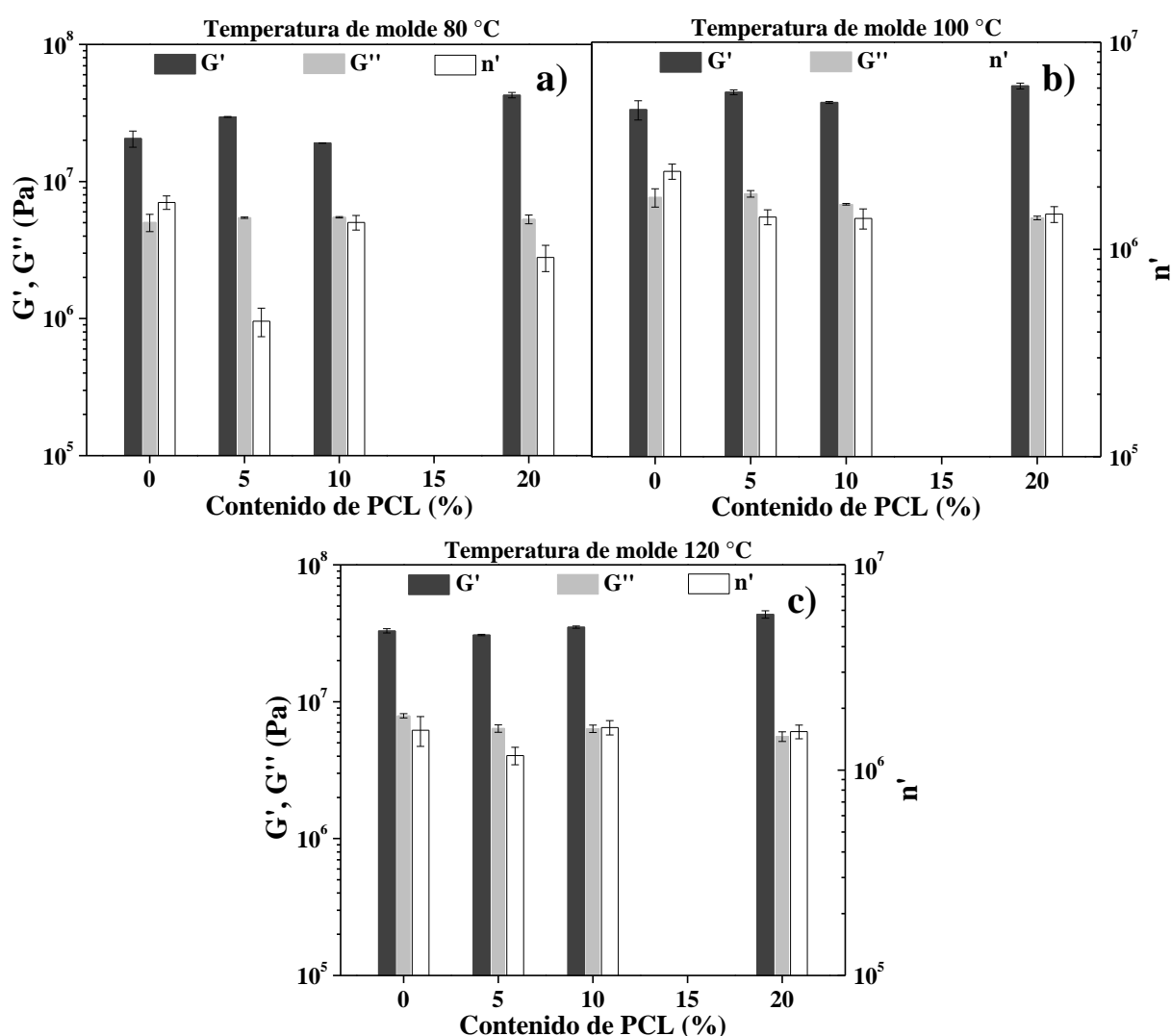
La Figura 56 muestra la evolución de los módulos viscoso y elástico ( $G'$  y  $G''$ ) y la viscosidad a 1 Hz para los biocompositos con base en biomasa de Consorcio D en función de la concentración de PCL, para las tres temperaturas de molde. Estos resultados se obtuvieron por medio de pruebas de barrido de frecuencia. Inicialmente, ambos módulos viscoso y elástico ( $G'$  y  $G''$ ), disminuyeron con la adición de 5% y 10% de PCL en la muestra. Finalmente, los sistemas con mayor contenido de PCL (20%) mostraron un aumento en ambos módulos viscoelásticos ( $G'$  y  $G''$ ) para todas las temperaturas de molde. En este sentido, se podría afirmar que existe un umbral de concentración de PCL relacionado con las propiedades mecánicas de los biocompositos. Por lo tanto, hay un mínimo contenido de PCL necesario para mejorar las propiedades viscoelásticas de los sistemas con base en Consorcio D [287, 297]. Los resultados confirman el refuerzo de la microestructura de los biocompositos a la concentración de PCL más alta (20%), debido a que ambos módulos viscoso y elástico ( $G'$  y  $G''$ ) exhibieron valores más altos después de la adición de PCL. Este resultado está relacionado con el desarrollo de una estructura tipo red dentro de los sistemas [298-300].



**Figura 56.** Evolución de los módulos viscoso y elástico ( $G'$  y  $G''$ ) y de la viscosidad a 1 Hz, para los biocompositos con base en biomasa de Consorcio D a las temperaturas de moldeo de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C en función de la concentración de PCL. Los resultados se obtuvieron a partir de barrido de frecuencia dinámica (de 0.05 a 20 Hz).

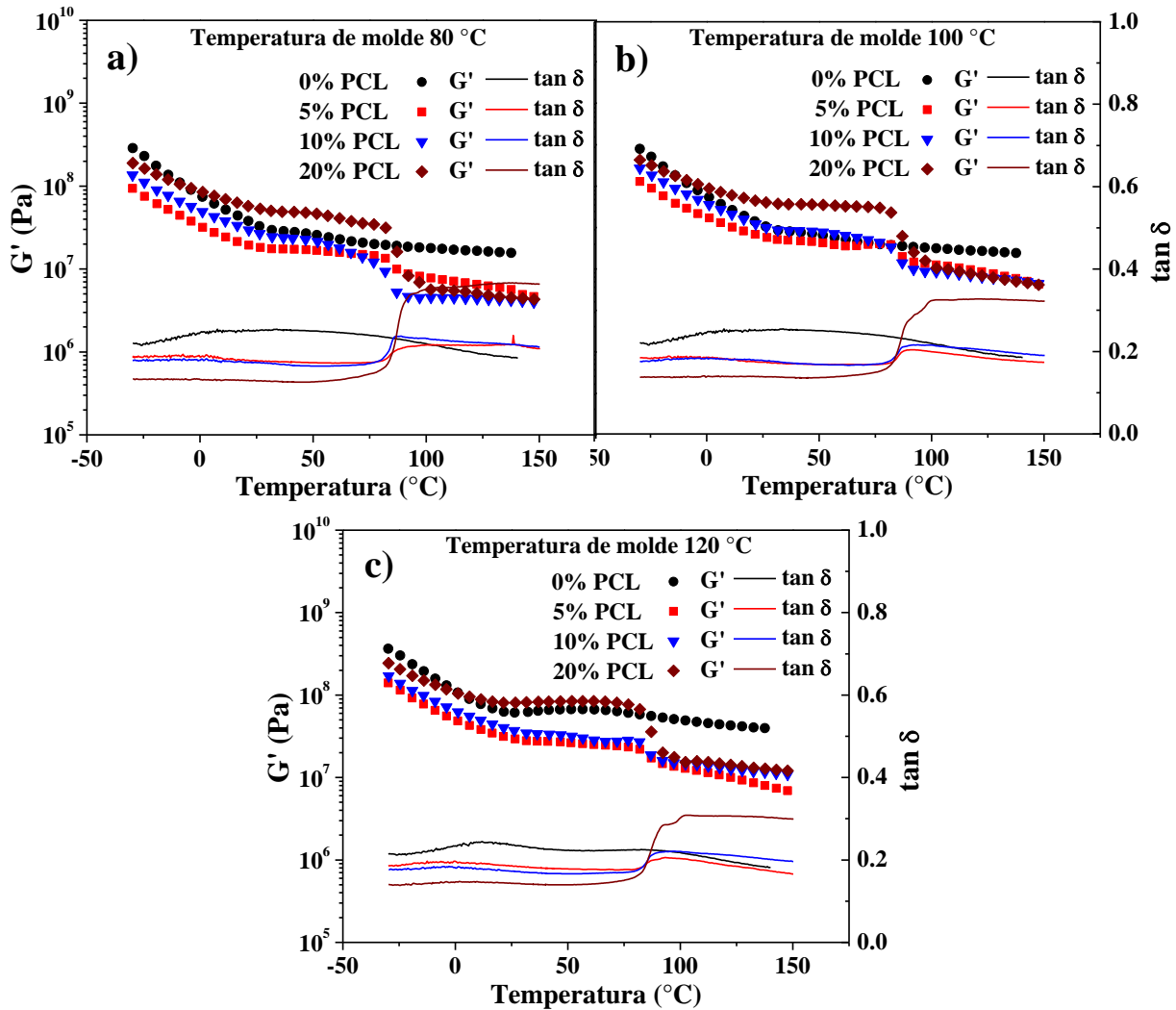
## 5. Resultados y Discusión

La Figura 57 muestra la evolución de los módulos viscoso y elástico ( $G'$  y  $G''$ ) y la viscosidad a 1 Hz para los biocompositos con base en biomasa del consorcio S en función de la concentración de PCL. De forma contraria a los resultados que se obtienen para los biocompositos con base en biomasa de Consorcio D, se observa un ligero aumento en los módulos viscoso y elástico ( $G'$  y  $G''$ ) con la adición de 5% y 10% de PCL. De forma similar, los sistemas con mayor contenido de PCL (20%) presentaron módulos viscoso y elástico más altos ( $G'$  y  $G''$ ) para todas las temperaturas de molde. En este caso no hay un mínimo contenido de PCL necesario para mejorar las propiedades viscoelásticas de los sistemas [287, 297]. Todos los sistemas exhibieron un aumento en ambos módulos con el aumento de la temperatura de molde; de igual forma que para los sistemas con base en biomasa de Consorcio D. Los resultados confirman el refuerzo de la microestructura de los biocompositos debido a que ambos módulos viscoso y elástico ( $G'$  y  $G''$ ) exhibieron valores más altos después de la adición de PCL. Otro resultado importante es la disminución de la pendiente con el aumento de la concentración de PCL para todas las temperaturas de molde. Este resultado está relacionado con el aumento del número de enlaces covalentes que fortalecen la estructura del sistema.



**Figura 57.** Evolución de los módulos viscoso y elástico ( $G'$  y  $G''$ ) y de la viscosidad a 1 Hz, para los biocompositos con base en biomasa del consorcio S, a las temperaturas de moldeo de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C, en función de la concentración de PCL. Los resultados se obtuvieron a partir de barrido de frecuencia dinámica (de 0.05 a 20 Hz).

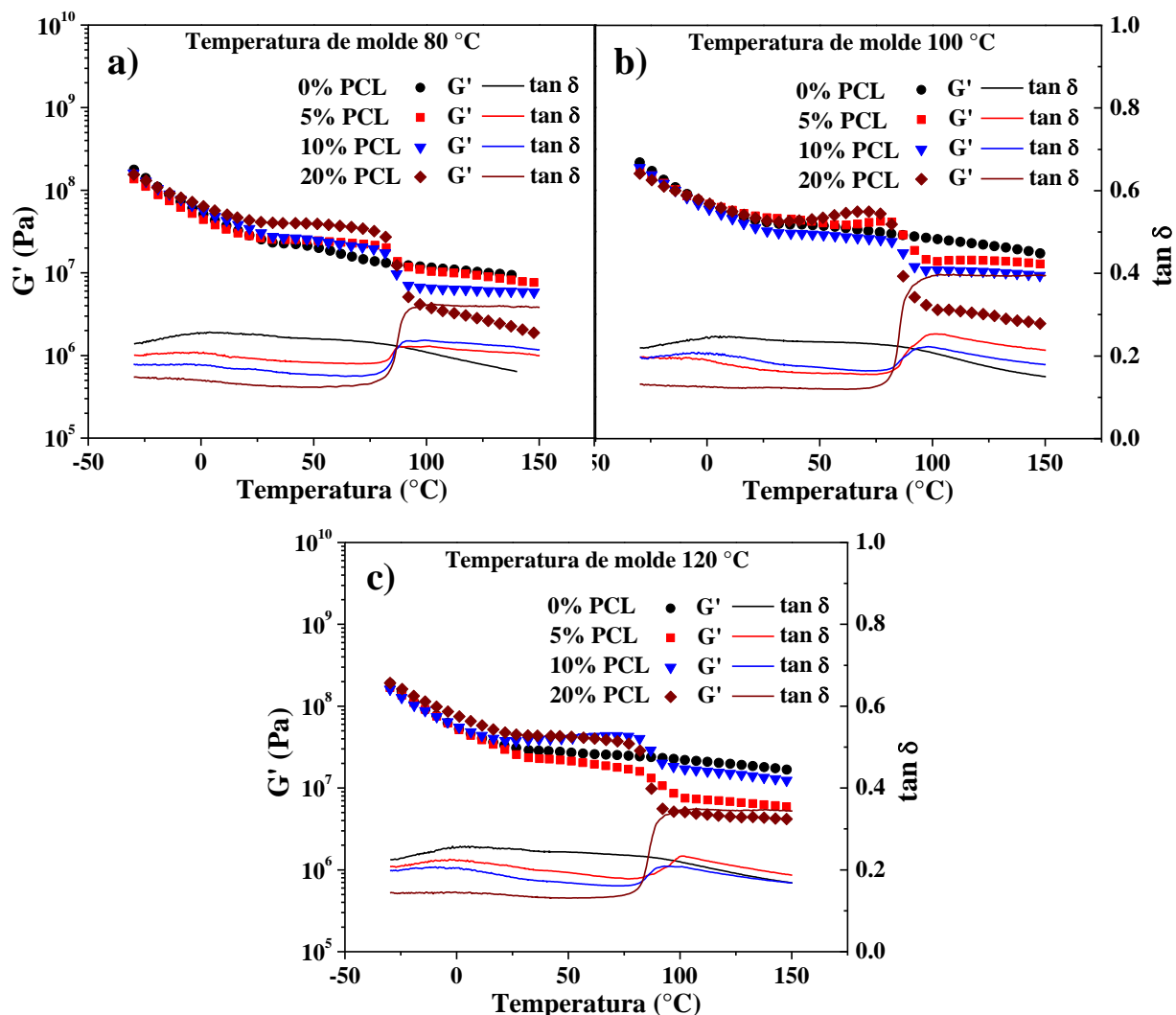
## 5. Resultados y Discusión



**Figura 58.** Módulo elástico ( $G'$ ) y tangente de pérdida ( $\delta$ ) para los biocompositos con base en biomasa del consorcio D a las temperaturas de moldeo de a) 80  $^{\circ}\text{C}$ , b) 100  $^{\circ}\text{C}$  y c) 120  $^{\circ}\text{C}$ , en función de la temperatura (de 25 a 150  $^{\circ}\text{C}$ ). Los resultados se obtuvieron a partir de análisis mecánico dinámico (DMA).

La Figura 58 muestra las rampas de temperatura que se obtuvieron a partir de un análisis mecánico dinámico, para los sistemas realizados con base en biomasa del consorcio D. La evolución del módulo elástico confirmó que debajo de la temperatura de fusión, la adición de PCL produjo materiales con mayores propiedades viscoelásticas para los sistemas que contenían PCL, a una concentración de 20%. Este aumento no fue proporcional a la cantidad total de PCL en los sistemas, lo que concuerda con los resultados obtenidos a partir del barrido de frecuencia dinámica. Este resultado sugiere que la estructura de los biocompuestos a concentraciones de PCL menores a 20% estaba dominada por la biomasa, mientras que la estructura de los biocompuestos con concentraciones de PCL de 20% estaba dominada por el polímero sintético biodegradable. Cuando se alcanzó el punto de fusión de PCL (60  $^{\circ}\text{C}$ ), el módulo elástico disminuyó para aquellos sistemas que contienen PCL. Este comportamiento está relacionado con la desestabilización del sistema, debido a la fusión o degradación de un componente con temperaturas de fusión significativamente diferentes al resto de los componentes que forman el sistema [286, 301].

## 5. Resultados y Discusión



**Figura 59.** Módulo elástico ( $G'$ ) y tangente de pérdida ( $\delta$ ) para los biocompositos con base en biomasa del consorcio S a las temperaturas de moldeo de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C en función de la temperatura (de 25 a 150 °C). Los resultados se obtuvieron a partir de análisis mecánico dinámico (DMA).

La Figura 59 muestra las rampas de temperatura obtenidas a partir de un análisis mecánico dinámico para los sistemas realizados con base en biomasa del consorcio S. A diferencia de los sistemas con base en biomasa del consorcio D los sistemas con base en biomasa del consorcio S sí presentaron una evolución en el módulo elástico con la adición y el aumento de la concentración de PCL. Por debajo de la temperatura de fusión del PCL, el módulo elástico incrementó a medida que aumentó la concentración de PCL. Este resultado sugiere que la estructura de los sistemas con base en biomasa del consorcio S estaba dominada por el PCL. Además también se puede inferir que el sistema se encontraba bien integrado lo que permitió que se pudieran formar interacciones entre el PCL y las proteínas. Cuando se alcanzó el punto de fusión de PCL (60 °C) el componente elástico disminuyó para aquellos sistemas que contienen PCL. La disminución del comportamiento elástico es proporcional a la concentración de PCL en el sistema, en la mayoría de los casos. Nuevamente estos resultados concuerdan con los resultados que se obtienen a partir del barrido de frecuencia dinámica para estos sistemas.

5.5.5 Mediciones de resistencia a la tracción

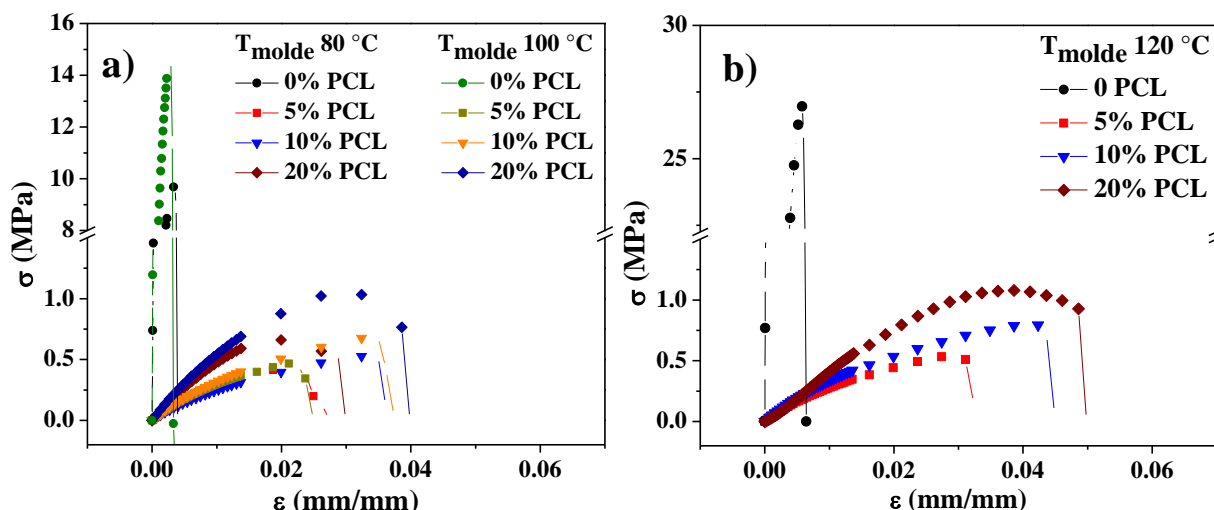


Figura 60. Curvas de tensión obtenidas de las pruebas de tensión uniaxiales para los sistemas con base en biomasa del consorcio D y PCL (0, 5, 10 y 20%) a temperatura de moldeo de a) 80 y 100 °C y b) 120 °C.

Tabla 35. Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo ( $\sigma_{max}$ ) y deformación a la rotura ( $\epsilon_r$ ) para los sistemas con base en biomasa del consorcio D y PCL.

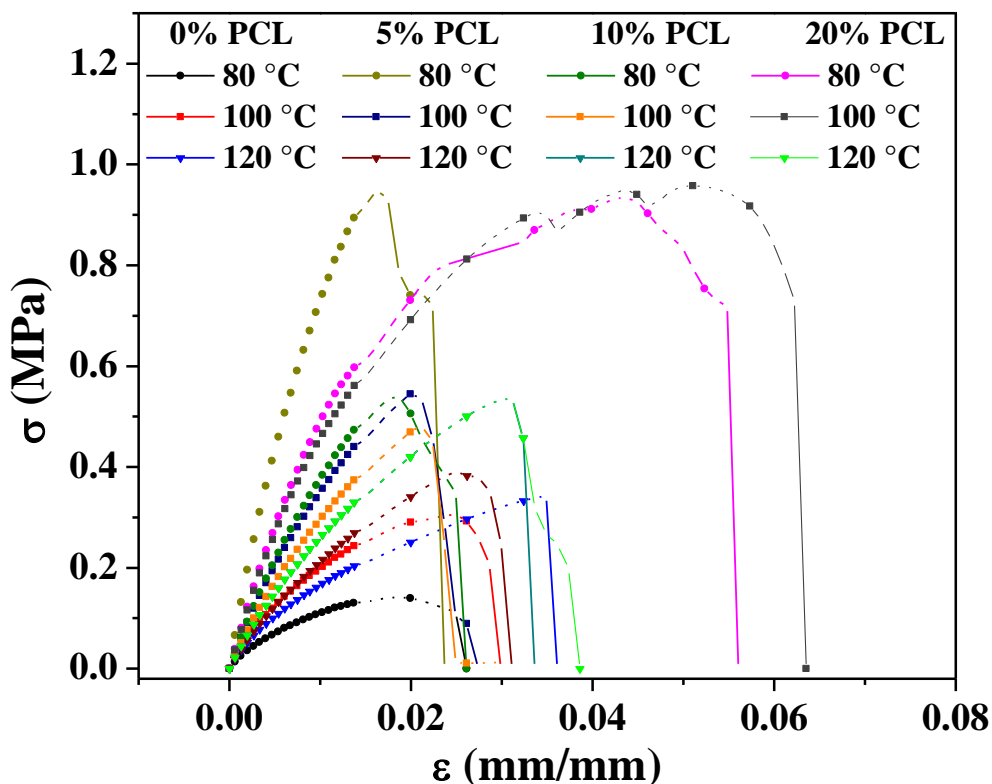
Concentración de PCL (%)	Temperatura de moldeo	Modulo de Young (MPa)	$\sigma_{max}$ (MPa)	$\epsilon_r$ (%)
0	80 °C	198.27 ± 6.28	9.48 ± 0.90	0.331 ± 0.02
	100 °C	112.78 ± 3.48	15.8 ± 1.6	0.276 ± 0.01
	120 °C	100.67 ± 10.63	28.75 ± 2.35	0.563 ± 0.07
5%	80 °C	35.69 ± 0.67	0.46 ± 0.04	2.43 ± 0.25
	100 °C	39.84 ± 1.05	0.35 ± 0.05	1.46 ± 0.80
	120 °C	36.47 ± 0.99	0.48 ± 0.06	3.14 ± 0.42
10%	80 °C	34.22 ± 0.22	0.49 ± 0.06	3.18 ± 0.50
	100 °C	40.21 ± 0.28	0.57 ± 0.08	3.11 ± 0.37
	120 °C	41.58 ± 0.61	0.80 ± 0.10	4.28 ± 0.55
20%	80 °C	58.89 ± 1.07	0.76 ± 0.10	2.82 ± 0.85
	100 °C	62.35 ± 0.90	0.99 ± 0.09	3.67 ± 0.31
	120 °C	34.75 ± 0.12	1.04 ± 0.12	4.24 ± 0.58

En la Tabla 35 se muestran los parámetros de tensión (módulo de Young, esfuerzo máximo y deformación a la rotura) obtenidas de las curvas de tensión que se muestran en la Figura 60. Los resultados muestran que la adición y el aumento en la cantidad de PCL hasta una concentración del 10% condujeron a una disminución en la pendiente de la región elástica y el esfuerzo máximo. Cuando la concentración de PCL incrementa de 10 a 20% se observa un ligero incremento de estos parámetros, sin embargo, los valores no están por arriba de los valores de los sistemas sin PCL. Esta tendencia no se observó para el parámetro  $\epsilon_r$ . En este



## 5. Resultados y Discusión

caso, la adición y aumento en la concentración de PCL dan como resultado valores de deformación a la rotura por arriba de los mostrados por lo sistemas sin PCL. Estos resultados nos hablan de que al añadir PCL a los sistemas se formaron materiales menos duros y con mejores propiedades viscoelásticas que para los sistemas que no contienen PCL, al ser materiales con mejores propiedades viscoelásticas son más difíciles de romper.



**Figura 61.** Curvas de tensión obtenidas de la pruebas de tensión uniaxiales para los sistemas con base en biomasa del consorcio S y PCL (0, 5, 10 y 20%).

Los resultados presentados en la Figura 61 y la Tabla 36 muestran que la adición de PCL a una concentración del 5% condujeron a una incremento en la pendiente de la región elástica y el esfuerzo máximo, sin embargo, una disminución en la deformación a la rotura. Cuando la concentración de PCL incrementa de 5 a 10% se observa una disminución de todos los parámetros de tensión. Finalmente se observó nuevamente un incremento de estos parámetros a la concentración de PCL más alta (20%). Los resultados muestran que en general la adición de PCL a los sistemas con base en biomasa del consorcio S presentaron un incremento en los parámetros de tensión en comparación con los sistemas que no contienen PCL. No obstante, para todos los sistemas que se obtuvieron a la temperatura de molde más alta (120 °C) se observa una importante disminución de los parámetros de tensión. Esto está relacionado con que a la temperatura de molde más alta (120 °C) se lleva a cabo un proceso de degradación de proteínas.

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 36.** Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo ( $\sigma_{\max}$ ) y deformación a la rotura ( $\epsilon_r$ ) para los sistemas con base en biomasa del consorcio S y PCL.

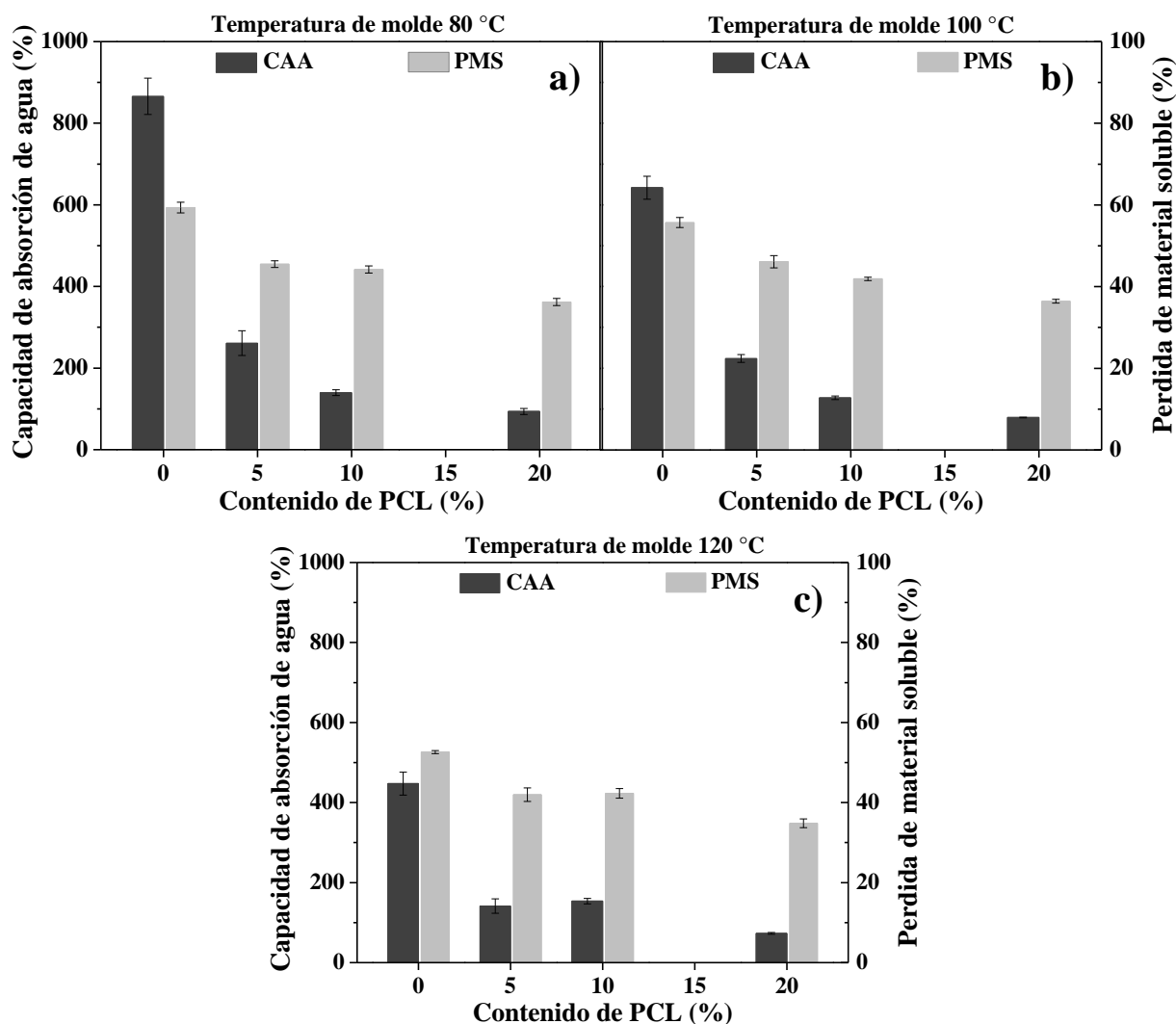
Concentración de PCL (%)	Temperatura de molde	Modulo de Young (Pa)	$\sigma_{\max}$ (MPa)	$\epsilon_r$ (%)
0	80 °C	11.60 ± 0.60	0.14 ± 0.015	0.33 ± 0.02
	100 °C	24.18 ± 2.55	0.33 ± 0.032	3.20 ± 0.34
	120 °C	21.22 ± 1.91	0.35 ± 0.087	4.81 ± 0.21
5%	80 °C	93.05 ± 4.54	0.83 ± 0.21	2.21 ± 0.97
	100 °C	44.32 ± 2.10	0.57 ± 0.17	2.8 ± 0.60
	120 °C	28.64 ± 0.55	0.43 ± 0.11	2.56 ± 0.21
10%	80 °C	46.15 ± 0.61	0.40 ± 0.14	1.84 ± 0.41
	100 °C	38.68 ± 1.24	0.43 ± 0.05	3.06 ± 0.68
	120 °C	31.20 ± 0.65	0.38 ± 0.09	2.74 ± 0.33
20%	80 °C	61.14 ± 0.97	0.84 ± 0.12	3.30 ± 1.12
	100 °C	54.09 ± 0.96	1.12 ± 0.17	5.23 ± 0.62
	120 °C	64.10 ± 2.27	1.24 ± 0.18	4.27 ± 0.55

### 5.5.6 Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble

La Figura 62 exhibe los valores para la capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble, para los sistemas con base en biomasa del consorcio D. La capacidad de absorción de agua se redujo a medida que incrementó la concentración de PCL. De igual forma la pérdida de material soluble disminuyó a medida que incrementó la concentración de PCL en los sistemas. Estos resultados pueden estar relacionados con la disminución de la capacidad de hinchamiento debido al refuerzo experimentado en la matriz de los sistemas cuando se añadió PCL [302]. La disminución en la pérdida de material soluble se relaciona con que el PCL no es soluble en agua, por lo tanto permaneció en la matriz biocompuesta después de la inmersión. Este resultado sugiere que la cantidad de PCL agregada al material biocompuesto no es solo capaz de mejorar las propiedades mecánicas (por ejemplo, el módulo de Young), sino también otras propiedades tecno-funcionales, como la capacidad de absorción en agua.

La temperatura de molde también tuvo un efecto directo en la capacidad de absorción de agua. La capacidad de absorción de agua se redujo a medida que aumentó la temperatura del molde. El incremento de la temperatura de molde permitió la formación de materiales más compactos, con microestructuras menos porosas. De forma contraria, la temperatura del molde no tuvo ningún efecto en la pérdida de material soluble.

## 5. Resultados y Discusión

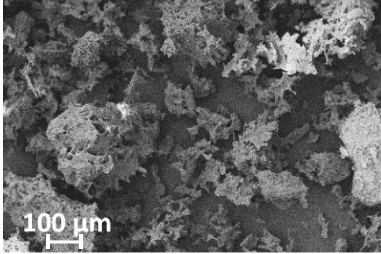
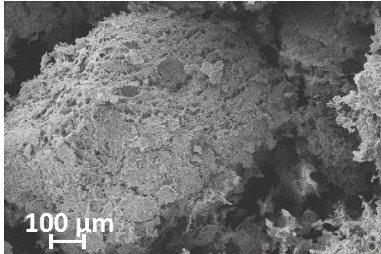
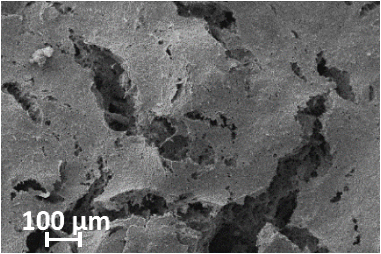
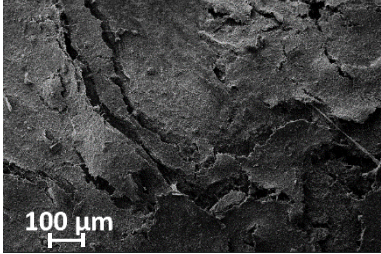
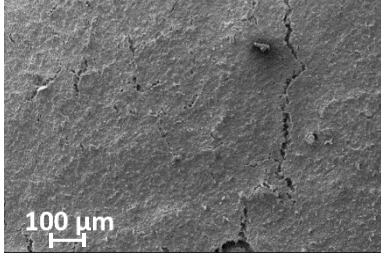
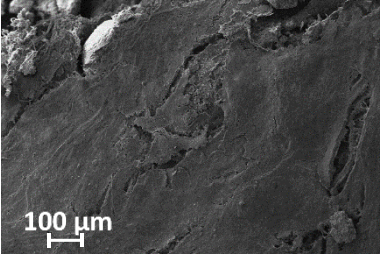
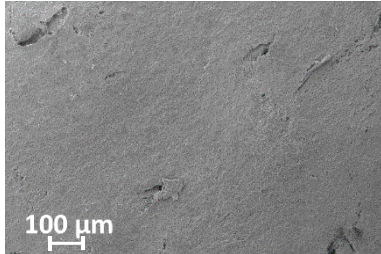
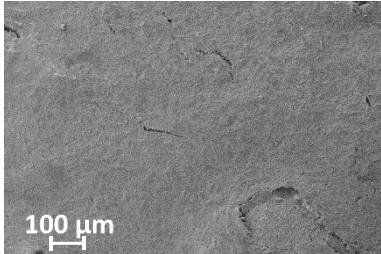
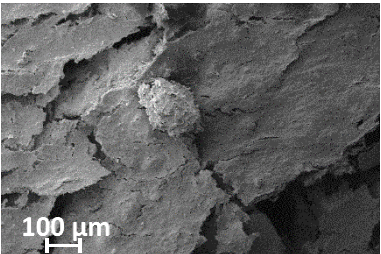
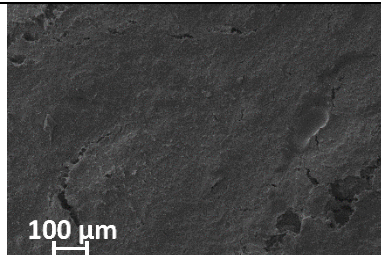
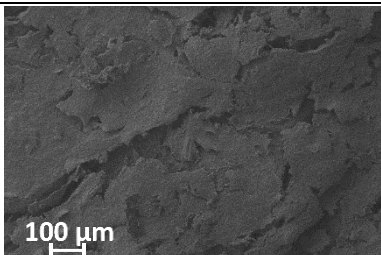
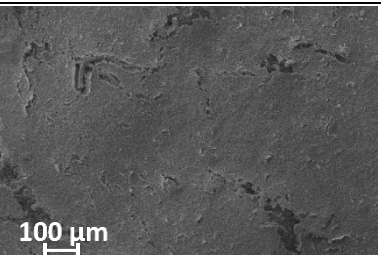


**Figura 62.** Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble después de 24 h de inmersión, para los sistemas con base en biomasa del consorcio D y PCL (0, 5, 10 y 20%) a temperatura de molde de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C.

La Tabla 37 muestra las imágenes por microscopía electrónica de barrido que se obtuvieron de los sistemas con base en biomasa del consorcio D. En las imágenes se pueden observar cambios en la microestructura de los sistemas, cuando se añadió PCL. Los materiales que no contenían PCL tuvieron mayor capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble tienen una estructura más porosa y por lo tanto perdieron su forma después de la inmersión en agua. Mientras que los materiales que contienen PCL muestran una estructura más uniforme y menos porosa a medida que aumentó la concentración del mismo en los sistemas. La uniformidad de los materiales y su poca capacidad de hinchamiento promovió que la estructura de los materiales se mantuviera después de su inmersión en agua.

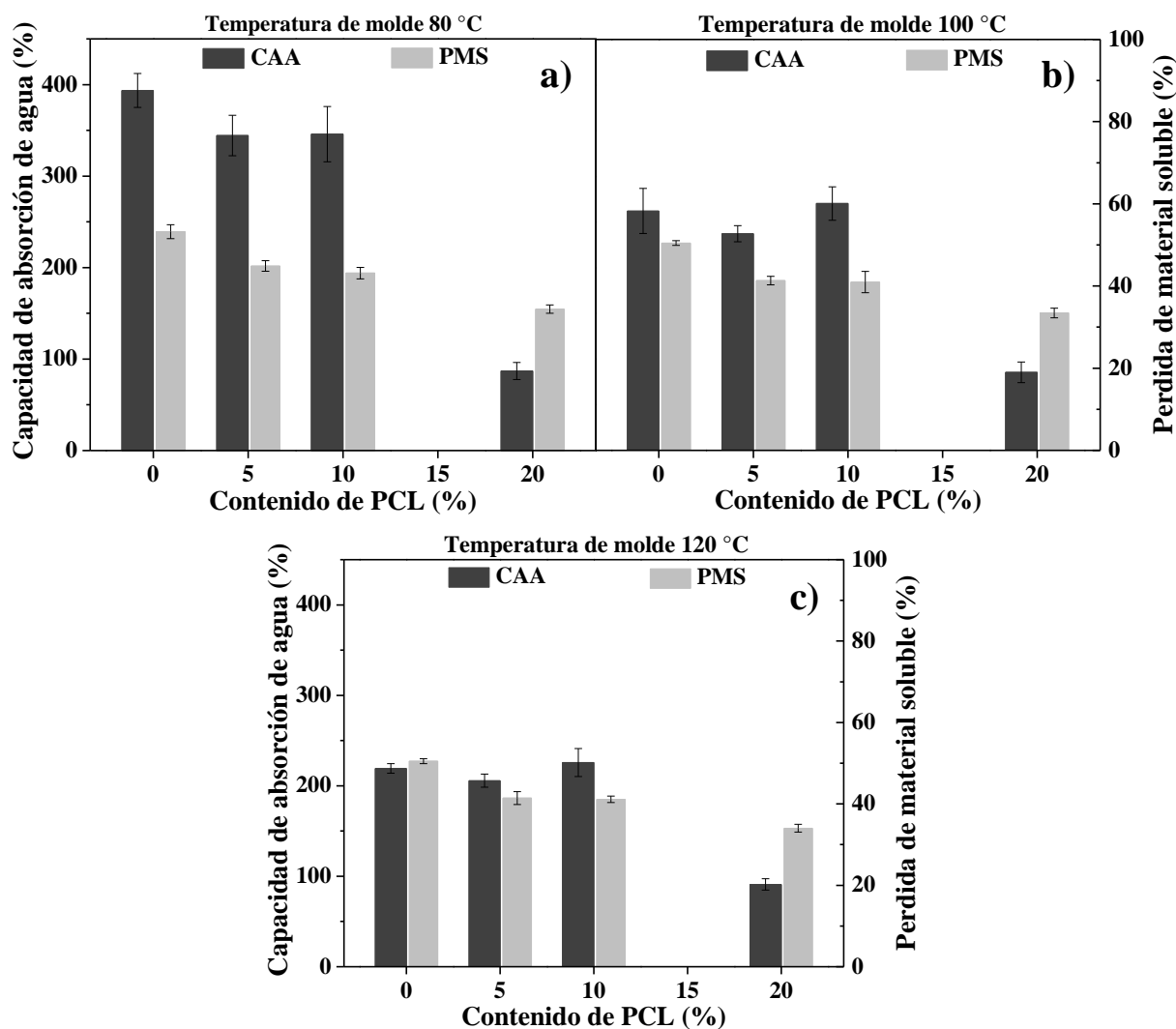
## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 37.** Imágenes por microscopía electrónica de barrido (MEB) de los biocompositos con base en biomasa del consorcio D.

Concentración de PCL (%)/ Temperatura de molde (°C)	80	100	120
0			
5			
10			
20			

## 5. Resultados y Discusión

Las Figura 63 exhibe los valores para la capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble para los sistemas con base en biomasa del consorcio S. De la misma manera que para los sistemas con base en biomasa del consorcio D la capacidad de absorción de agua se redujo a medida que incrementó la concentración de PCL, también la pérdida de material soluble disminuyó a medida que incrementó la concentración de PCL. La temperatura del molde mostró un efecto importante, ya que la capacidad de absorción de agua se redujo a medida aumentó la temperatura de molde. Es importante destacar que los sistemas con base en biomasa del consorcio D presentaron una capacidad de absorción de agua generalmente del doble que para los sistemas con base en biomasa del consorcio S.

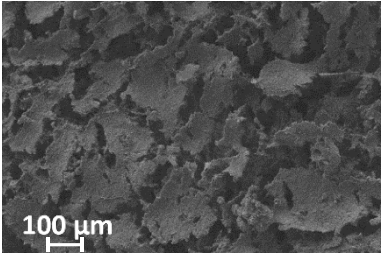
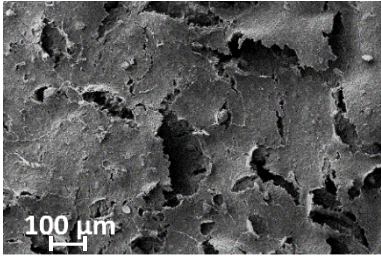
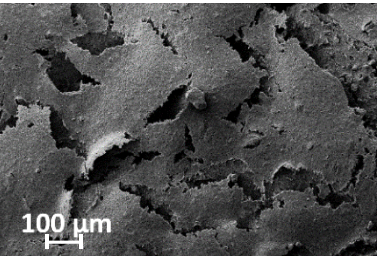
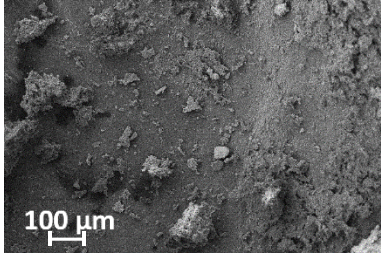
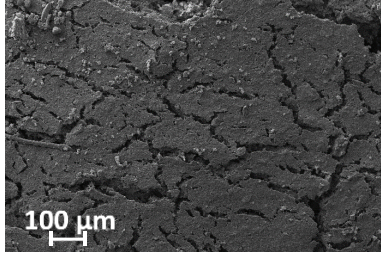
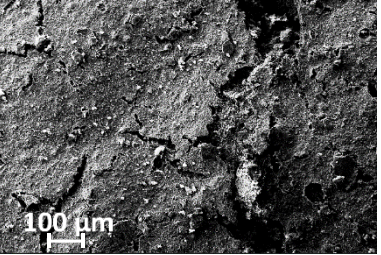
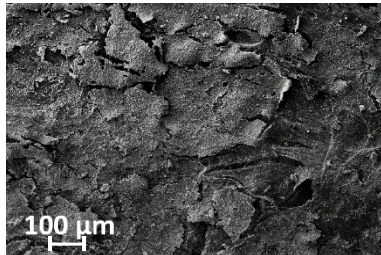
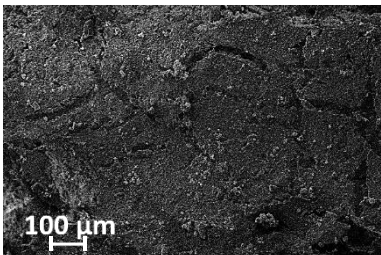
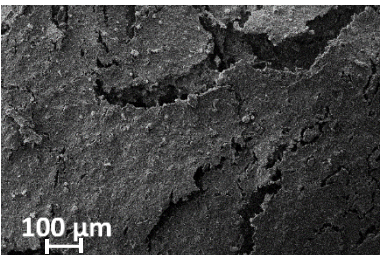
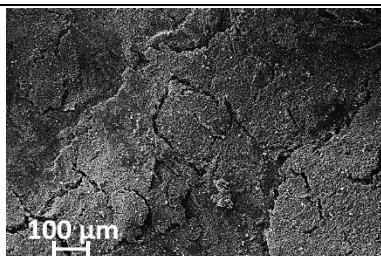
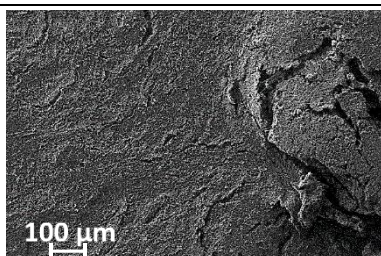
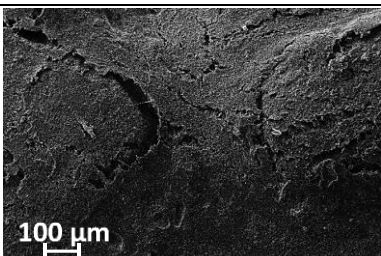


**Figura 63.** Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble después de 24 h de inmersión, para los sistemas con base en biomasa del consorcio S y PCL (0, 5, 10 y 20%) a temperatura de molde de a) 80 °C, b) 100 °C y c) 120 °C.

En la Tabla 38 se muestran las imágenes que se obtuvieron de la microscopía electrónica de barrido para los sistemas con base en biomasa del consorcio S. Las imágenes muestran que dichos materiales tuvieron una estructura menos porosa que los materiales con base en biomasa del consorcio D. Ninguno de los sistemas perdieron su estructura después de la inmersión en agua. A medida que aumentó el contenido de PCL en los sistemas la estructura se vuelve más uniforme y menos porosa lo que produce que se pierda su capacidad de hinchamiento.

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 38.** Imágenes por microscopía electrónica de barrido (MEB) de los biocompositos con base en biomasa del consorcio S.

Concentración de PCL (%)/ Temperatura de molde (°C)	80	100	120
0			
5			
10			
20			

---

## 5. Resultados y Discusión

---

La pared celular de las microalgas jugó un papel importante en la obtención tanto de bioplásticos como de biocompositos. Los resultados demuestran que la pared celular de *Desmodesmus sp.* (microalga que se encuentra en mayor proporción en el consorcio D) evita la interacción entre el PCL añadido a la mezcla y las proteínas presentes en la biomasa, a pesar de que el pretratamiento de la biomasa debió mejorar esta interacción debido a la rotura de la pared celular. Por lo tanto, fue necesario tener un contenido mínimo de PCL en la mezcla para mejorar las propiedades viscoelásticas de los materiales obtenidos. Esta barrera que ejerce la pared celular durante el proceso de obtención de biocompositos, induce que tanto las propiedades viscoelásticas de los sistemas como el esfuerzo máximo disminuyan considerablemente en comparación con los sistemas que no contienen PCL.

En el caso de los sistemas que se obtuvieron con base en biomasa del consorcio S la adición de PCL mejoró tanto las propiedades viscoelásticas de los sistemas así como los parámetros de tensión. Con estos resultados se puede concluir que el pretratamiento de biomasa de este consorcio ayudó a que los polímeros sintéticos y naturales presentes en la muestra tuvieran una buena interacción, y se formaran nuevas interacciones que refuerzan el material obtenido. Esto mejoró notablemente tanto las propiedades viscoelásticas como los parámetros de tensión de los materiales obtenidos a medida que aumento la concentración de PCL.

En la Tabla 39 se muestra la comparación de los biocompositos obtenidos en este estudio con biocompositos que se obtuvieron a partir de biomasa de otras especies de microalga. Como se muestra los biocompositos obtenidos en este estudio tuvieron propiedades viscoelásticas menores en comparación con otros sistemas que se obtuvieron con base en biomasa de otras especies de microalga. No obstante, los materiales que se obtienen en este estudio son los que tienen menor contenido de material sintético.

La aplicación de los biocompositos obtenidos incrementa en comparación de los materiales que no contienen PCL. Esto se debe a que la adición de PCL a las muestras mejora notablemente las propiedades viscoelásticas de los materiales e induce que los materiales conserven su forma después de su inmersión en agua. Por lo tanto, los biocompositos pueden ser aplicados a la obtención de macetas y recipientes.

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 39.** Comparación de casos de estudio de obtención de biocompositos con base en biomasa de microalgas.

Mezcla	Método de preparación	Contenido de proteína (%)	Máximo esfuerzo (MPa)	Deformación a la rotura (%)	Módulo de Young (MPa)	Referencia
<b>24% <i>Chlorella vulgaris</i>/11% Glicerol/65% Polietileno</b>	Moldeo por inyección	58	1.6	5.2	53	[293]
<b>24% <i>Spirulina plantesis</i>/11% Glicerol/65% Polietileno</b>	Moldeo por inyección	57	1.9	2.5	98	[293]
<b>10% <i>Nannochloropsis gaditana</i>/90% PBTA</b>	Moldeo por inyección	42	8	280	118	[303]
<b>30% <i>Botryococcus braunii</i>/70% Poli(butileno succinato)</b>	Moldeo por inyección	32	18	7.6	780	[304]
<b>20% <i>Nannochloropsis salina</i>/80% PVA</b>	Fundición	27 ± 3	10	20	500	[305]
<b>48% Consorcio D/32% Glicerol/20% PCL</b>	Moldeo por inyección	26	1	3.7	62	<b>Este estudio</b>
<b>48% Consorcio S/32% Glicerol/20% PCL</b>	Moldeo por inyección	29	1.12	5.2	54	<b>Este estudio</b>



### 5.6 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de proteínas de biomasa del consorcio D

#### 5.6.1 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de proteínas de biomasa del consorcio D en solución al 5%

El principal objetivo de la producción de membranas por electrohilado es darle un valor adicional a la biomasa de microalgas después de la producción de biocombustibles. Para poder llevar a cabo las membranas de electrohilado se prepararon soluciones de proteína a diferentes concentraciones. No obstante, para que estas soluciones puedan ser electrohiladas deben de cumplir con ciertas condiciones de conductividad eléctrica, tensión superficial y propiedades reológicas [303]. Además, la concentración de proteína debe ser lo suficientemente alta como para garantizar superposición entre las moléculas y así crear una red enredada que sea capaz de resistir los movimientos de estiramiento y flexión durante el electrohilado [304]. No obstante, los biopolímeros de grado alimenticio, como las proteínas de microalga, son en general difíciles de electrohilar [305]. La razón de esto aún no se entiende completamente. Diferentes estudios han sugerido que la amplia distribución del peso molecular de las proteínas y su compleja estructura química interfieren en el proceso de electrohilado [306].

Varios estudios han llevado a cabo con éxito el electrohilado de mezclas de proteínas y polisacáridos, como el acetato de celulosa en ácido acético. El acetato de celulosa es uno de esos polímeros que ofrece ventajas como ser abundante, biocompatible, biodegradable, químicamente resistente y de bajo precio [307]. Las fibras fabricadas con base en acetato de celulosa por técnicas de electrohilado presentan propiedades como alta porosidad, alta área superficial y viabilidad. En virtud de estas propiedades, en este trabajo de tesis se eligió el acetato de celulosa como polímero para obtener membranas con base en acetato de celulosa/proteínas del consorcio D. Sin embargo, debido a que la biomasa de microalgas se sometió a diferentes pretratamientos para poder llevar a cabo la extracción de proteínas, en primera instancia se estudió el electrohilado de soluciones de proteína sin polímero. Esto permite evaluar el efecto del pretratamiento en las propiedades físicas de las proteínas a electrohilar, así como determinar si el pretratamiento aplicado favorece la formación de membranas de electrohilado de proteína pura. Diferentes estudios han demostrado que las membranas que se obtienen a partir de acetato de celulosa en solución al 17% son las que presentan mejores propiedades [308]. Por lo tanto, el blanco del estudio fue una solución de acetato de celulosa (AC) al 17% en ácido acético al 80%. Las soluciones de proteína fueron preparadas a una concentración de 5% en peso, debido a que esta fue la cantidad máxima de proteína posible de disolver en solución de ácido acético al 80%. Las propiedades físicas de las soluciones preparadas se muestran en la Tabla 40.

Las soluciones de proteína de microalga tienen la misma concentración y todas fueron preparadas al mismo pH (1), debido a esto, la densidad permaneció casi constante. Es sabido que la densidad es una función lineal de la concentración del polímero, siempre y cuando presente un comportamiento Newtoniano [309]. Las soluciones de proteína presentaron conductividad muy alta en comparación con el acetato de celulosa. Esto favorece el proceso de electrohilado, ya que mientras mayor sea la conductividad, mayor será el transporte de cargas. De la misma forma, las soluciones de proteína presentaron menor tensión superficial que la solución de AC. Esto es favorable, ya que una alta tensión superficial produce defectos en las fibras.

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 40.** Propiedades físicas de las soluciones de proteína de biomasa del consorcio D a 25 °C.

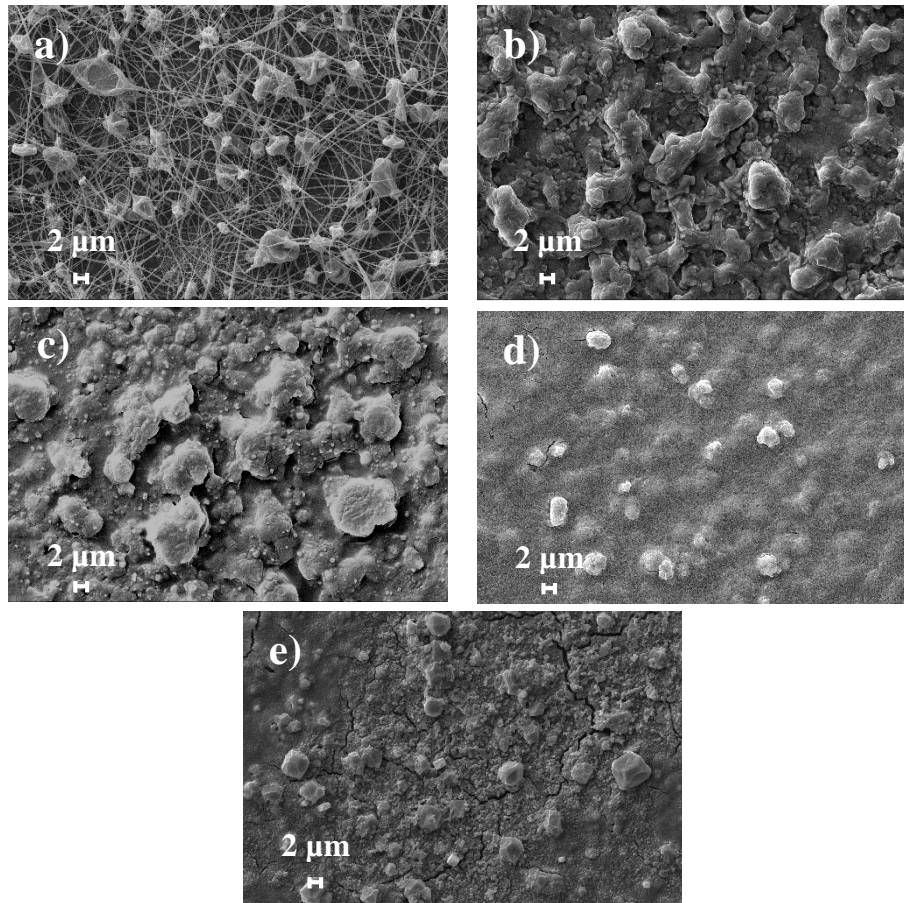
Pretratamiento	[Proteína] %	Tensión superficial (mN/cm)	Conductividad ( $\mu$ S/cm)	Densidad (gr/cm <sup>3</sup> )	Viscosidad (Pas)
AC	17	34.38 $\pm$ 0.07	25.6		34.38
Sin pretratamiento	5	28.35 $\pm$ 0.02	3890	1.080	0.016
Ultrasonido (50 kWh/kg biomasa)	5	27.97 $\pm$ 0.05	3670	1.075	0.008
Ultrasonido (125 kWh/kg biomasa)	5	28.29 $\pm$ 0.05	3470	1.080	0.006
Ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L)	5	28.2 $\pm$ 0.04	3590	1.085	0.013

Los datos se muestran como media  $\pm$  DS, derivados de mediciones por triplicado.

La viscosidad aparente se obtuvo a partir del ensayo de flujo en las medidas reológicas. Los valores de la viscosidad se tomaron a los 10 s<sup>-1</sup>, para poder comparar los diferentes sistemas. La viscosidad de las soluciones de proteína es entre 4 y 5 órdenes de magnitud menor que para la solución de acetato de celulosa. Por lo tanto, se espera que el proceso de electrohilado muestre una fuerte dependencia de la viscosidad de la solución.

Para obtener membranas de nanofibras, las soluciones de proteínas se sometieron a electrohilado utilizando parámetros de referencia, es decir, caudal de salida de 0.3 mL/h, una diferencia de potencial eléctrico de 25 kV, la distancia entre la aguja y el capilar fue 10 cm y un colector plano. En todos los procesos de electrohilado se tuvo en cuenta que la humedad relativa fuera menor del 50%, llegando a no realizarse el proceso a humedades mayores.

Debido a la naturaleza de las proteínas no fue posible obtener membranas por electrohilado a partir de soluciones de proteína sin la adición de polímero. Las proteínas de microalga tienen estructura globular, lo que presenta muchos desafíos para llevar a cabo el proceso de electrohilado. Debido a que no se comportan como polímeros clásicos y no tienen las propiedades viscoelásticas esenciales para un electrohilado estable. Sin embargo, se formó un electroespreado, los electroespreados formados se evaluaron mediante microcopia electrónica de barrido, Figura 64. Como se puede observar, los electroespreados formados presentaron variaciones en sus tamaños. Los electroespreados que presentaron mayor tamaño (a y b) corresponden a los electroespreados con base en proteínas de biomasa de microalgas sin pretratamiento o bien que fue pretratada a las condiciones experimentales más suaves (50 kWh/kg de biomasa seca). Por lo tanto, es posible que esto se deba al tamaño de las proteínas presentes en solución. Ya que en la sección 5.3.2 se observó que, a medida que las condiciones de pretratamiento de biomasa eran más intensas, el peso molecular de las proteínas extraídas tendía a disminuir.



**Figura 64.** Imágenes de microscopia (MEB) de: a) membrana de electrohilado de AC y electroespreados de proteína del consorcio D b) sin pretratamiento, c) pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg de biomasa), d) pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg de biomasa) y e) pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L), (magnificación x2 000).

### 5.6.2 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de los sistemas AC 17% /proteínas de biomasa del consorcio D

#### 5.6.2.1 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema AC 17% /proteínas de biomasa del consorcio D sin pretratamiento

Debido a que no fue posible obtener membranas por electrohilado a partir de soluciones de proteína de microalga, se optó por un sistema de dos componentes: carbohidratos/proteína. El sistema estudiado fue acetato de celulosa (AC) 17%/ proteína de microalgas. Adicionalmente se estudió el efecto del pretratamiento aplicado a la biomasa para llevar a cabo la extracción de proteínas en el proceso de electrohilado y el efecto de la concentración de proteína. Las concentraciones de proteínas estudiadas fueron 0.75%, 1.25%, 2.5% y 5% en peso. Los resultados se presentan con base en el pretratamiento aplicado, la caracterización física de las soluciones AC 17%/proteína biomasa del consorcio D sin pretratamiento se muestran en la Tabla 41.

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 41.** Propiedades físicas de las soluciones AC/de proteína de biomasa del consorcio D sin pretratamiento a 25 °C.

Muestra	[AC/Proteína] %	Tensión superficial (mN/cm)	Conductividad (μS/cm)	Viscosidad (Pa·s)
AC	[17]	34.38 ± 0.07	25.6	34.38
AC/Sin pretratamiento	[17/0.75]	33.38 ± 0.13	439	1.35 ± 0.05
AC/Sin pretratamiento	[17/1.25]	32.45 ± 0.16	312	2.20 ± 0.22
AC/Sin pretratamiento	[17/2.5]	31.78 ± 0.14	450	2.40 ± 0.11
AC/Sin pretratamiento	[17/5]	31.50 ± 0.13	803	2.80 ± 0.27

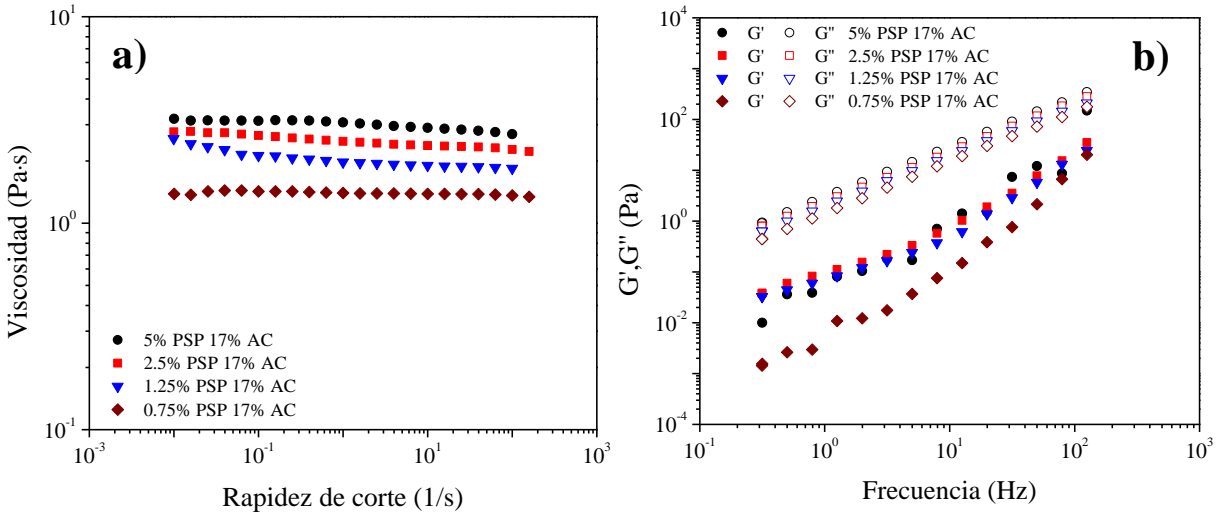
Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

Nuevamente, las soluciones de proteína se sometieron a electrohilado utilizando parámetros de referencia, es decir, caudal de salida de 0.3 mL/h, una diferencia de potencial eléctrico de 25 kV, una distancia entre la aguja y el capilar de 10 cm y un colector plano. En todos los procesos de electrohilado se tuvo en cuenta que la humedad relativa fuera menor del 50%, llegando a no realizarse el proceso a humedades mayores.

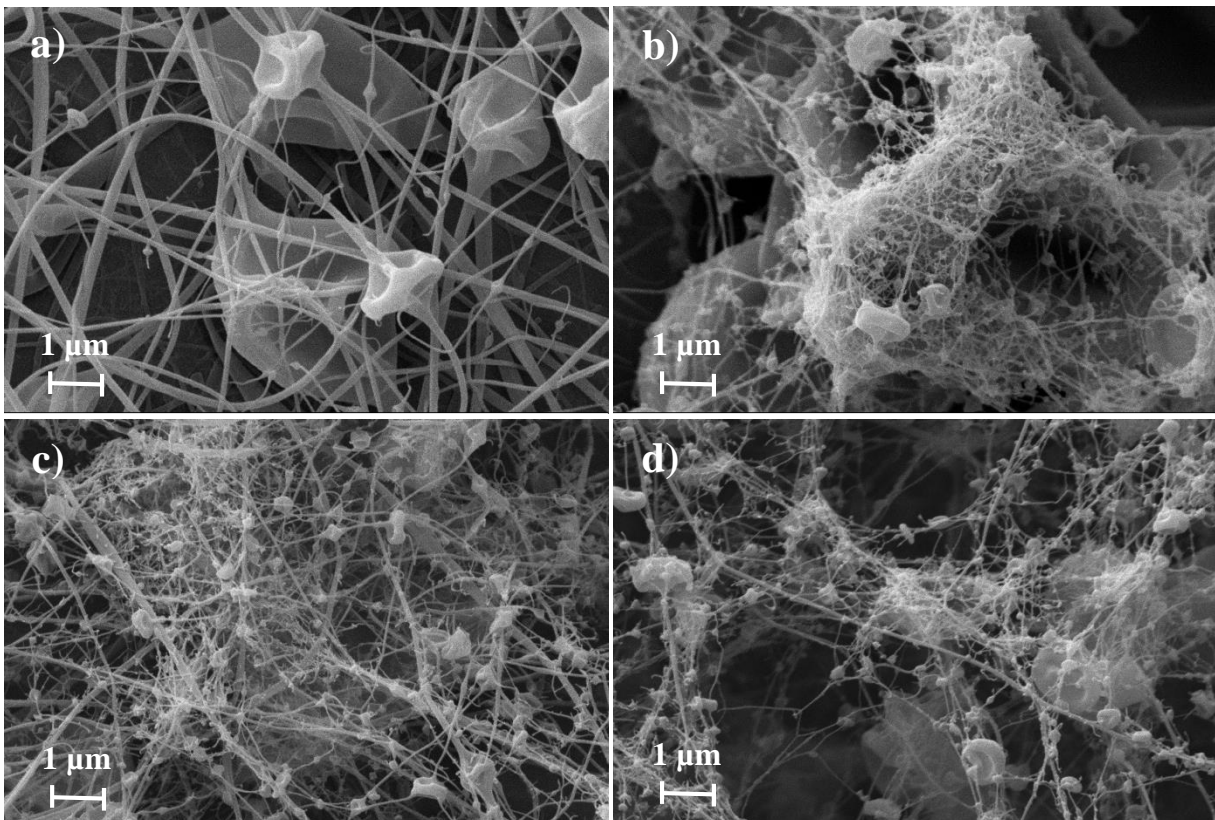
El pH de las soluciones preparadas fue de 1 en todos los casos. La adición de proteína a la solución de acetato de celulosa no muestra un efecto importante en la tensión superficial. Sin embargo, la conductividad aumentó de forma considerable al añadir proteína al sistema y desciende a medida que disminuye la concentración de proteína. Como se mencionó, el aumento en la conductividad favorece el proceso de electrohilado, ya que mientras mayor sea la conductividad, mayor será el transporte de cargas. La viscosidad de las soluciones a 10 s<sup>-1</sup> disminuye considerablemente al añadir proteína de microalgas al sistema y a medida que disminuye la concentración de proteína. No obstante, los resultados que se presentan en la Figura 65a muestran que las soluciones presentan un comportamiento newtoniano, ya que la viscosidad no depende de la rapidez de corte y se mantiene prácticamente constante.

El análisis mecánico dinámico para las soluciones de proteína se presenta en la Figura 65b. Como se observa en la gráfica, a medida que aumentó la concentración de proteína en los sistemas, aumentaron los módulos G' y G''. Esto sugiere que una mayor concentración de proteína proporciona mayor consistencia y reforzamiento a la solución. Además, el modulo G'' es mayor que el modulo G', por lo que las disoluciones son predominantemente viscosas.

## 5. Resultados y Discusión



**Figura 65.** Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas AC/proteína del consorcio D sin pretratamiento a 25 °C y b) propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia de los sistemas AC/proteína del consorcio D sin pretratamiento a 25 °C.



**Figura 66.** Imágenes por microscopia (MEB) a escala de 1 μm (magnificación x10 000) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) AC 17% y AC 17%/proteína del consorcio D sin pretratamiento a: b) 1.25%, c) 2.5% y d) 5% en peso.

## 5. Resultados y Discusión

En las imágenes, se observa que las fibras electrohiladas presentan una gran cantidad de defectos a todas las concentraciones, Figura 66. La cantidad de defectos incrementó a medida que aumentó la concentración de proteína en el sistema. Adicionalmente, se observa la formación de cúmulos o agregados que aparentemente incrementaron en tamaño a medida que aumentó la concentración de proteína en la solución. Esto se puede atribuir al pH de la solución en el que las proteínas fueron disueltas. Ya que como se mencionó anteriormente la solubilidad de las proteínas es dependiente de su punto isoeléctrico. La Figura 40 de la sección 5.3.3 muestra que el punto isoeléctrico de las proteínas del consorcio D sin pretratamiento es cercano a pH 3, ya que a este pH la proteína muestra solubilidad mínima. Dado que el pH (1) de la solución de ácido acético al 80% en el que las proteínas son disueltas es cercano a su punto isoeléctrico, es posible que las proteínas se encuentren formando agregados en la solución, lo que evita que se puedan electrohilar de forma eficiente.

En la Tabla 42 se muestra el diámetro medio de las nanofibras determinados mediante análisis de imagen con el programa ImageJ, así como sus correspondientes valores promedio y desviaciones típicas. Como se mencionó anteriormente, el tamaño de los cúmulos o agregados formados durante el proceso aumentó a medida que incrementó la concentración de proteína en la solución. Esto sugiere que se pudieron formar mayor cantidad de agregados o bien como se muestra en las micrografías los agregados aumentaron de tamaño con el incremento de la concentración de proteína, lo que evito que se llevara a cabo el proceso de electrohilado. Por lo tanto, las membranas que se obtuvieron carecían de las propiedades necesarias para llevar a cabo un ensayo de resistencia a la tracción. El diámetro de fibra, por otra parte, disminuyó con el incremento de la concentración de proteína, las fibras se vuelven más heterogéneas, con diámetros uniformes, lo que deriva en una desviación estándar baja.

**Tabla 42.** Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas AC 17%/proteínas del consorcio D sin pretratamiento, en función de la concentración.

Sistema	[AC/Proteína] %	Diámetro promedio (nm)
AC	17	122.02 ± 55.2
AC/Sin pretratamiento	17/0.75	184.4 ± 101.8
AC/Sin pretratamiento	17/1.25	44.6 ± 20.8
AC/Sin pretratamiento	17/2.5	62.1 ± 31.8
AC/Sin pretratamiento	17/5	34.7 ± 17.4

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.6.2.2 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema AC 17% /proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa)

La caracterización física de las soluciones AC/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg de biomasa) se muestran en la Tabla 43.

**Tabla 43.** Propiedades físicas de las soluciones AC/de proteína del consorcio D pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg de biomasa) y 25 °C.

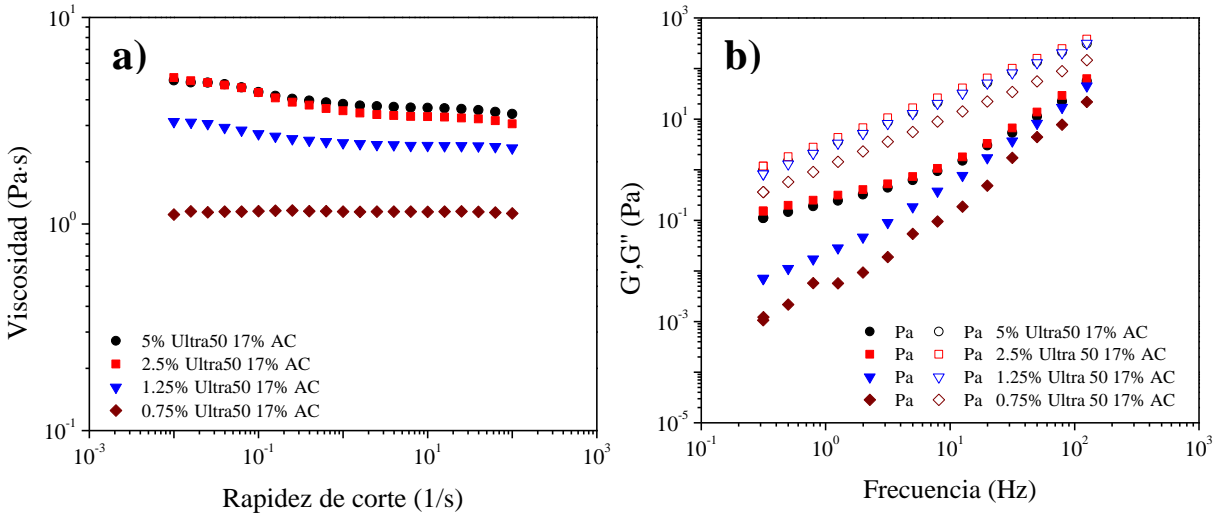
Muestra	[AC/Proteína] %	Tensión superficial (mN/cm)	Conductividad ( $\mu$ S/cm)	Viscosidad (Pa·s)
AC	[17]	34.38 $\pm$ 0.07	25.6	34.38
AC/Ultra50	[17/0.75]	33.20 $\pm$ 0.06	194.6	1.14
AC/Ultra50	[17/1.25]	33.27 $\pm$ 0.10	547	2.54 $\pm$ 0.07
AC/Ultra50	[17/2.5]	33.69 $\pm$ 0.32	777	3.10 $\pm$ 0.43
AC/Ultra50	[17/5]	30.88 $\pm$ 0.15	606	3.35 $\pm$ 0.45

Los datos se muestran como media  $\pm$  DS, derivados de mediciones por triplicado.

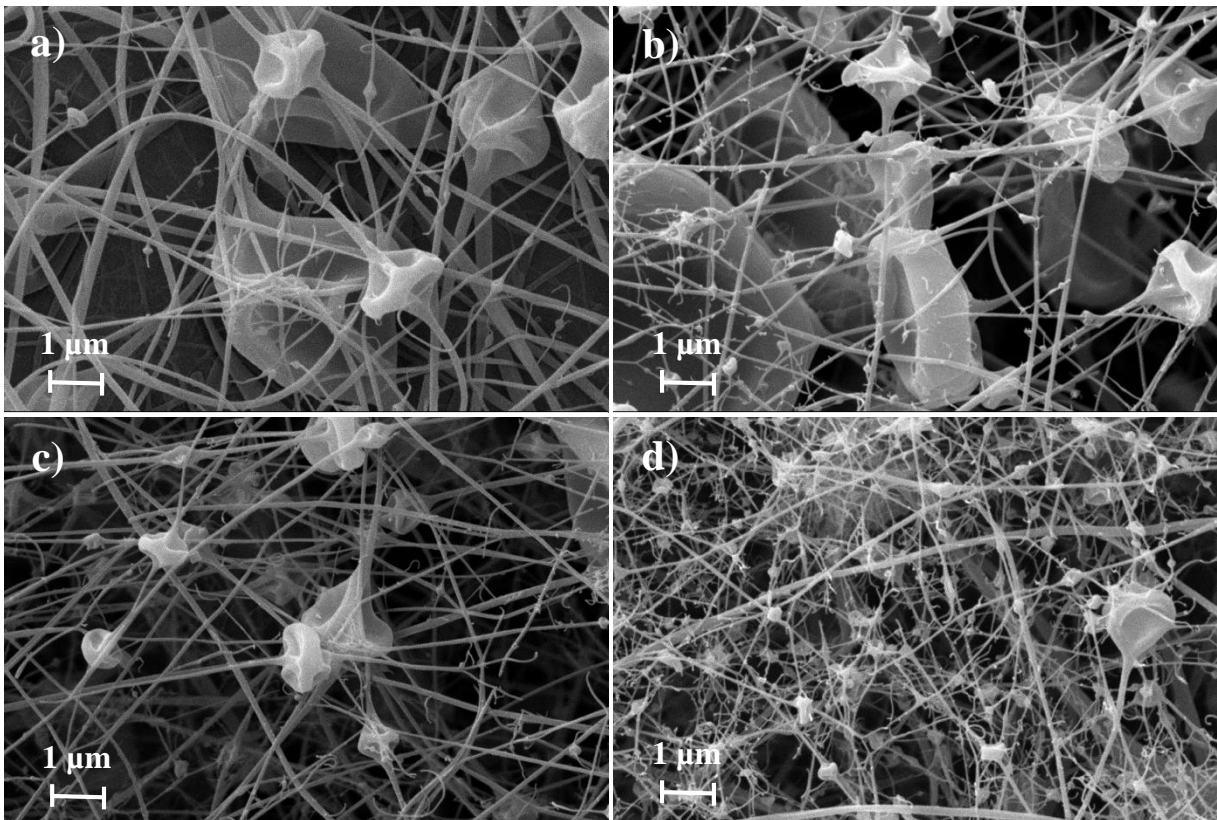
La adición de proteína de biomasa pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) a la solución de acetato de celulosa no muestra un efecto importante en la tensión superficial. No obstante, nuevamente la conductividad aumentó de forma considerable al añadir proteína al sistema y descendiendo a medida que disminuye la concentración de proteína. La viscosidad de las soluciones a  $10 \text{ s}^{-1}$  disminuye considerablemente al añadir proteína de microalgas al sistema y a medida que disminuye la concentración de proteína. Sin embargo, los resultados en la Figura 67a muestran nuevamente que las soluciones tienen un comportamiento newtoniano, ya que la viscosidad no depende de la rapidez de corte y se mantiene prácticamente constante.

El análisis mecánico dinámico para las soluciones de proteína se presenta en la Figura 67b. A medida que aumentó la concentración de proteína en los sistemas, aumentaron los módulos  $G'$  y  $G''$ . Esto sugiere que una mayor concentración de proteína proporciona mayor consistencia y reforzamiento a la solución. Además, el módulo  $G''$  es mayor que el módulo  $G'$ , por lo que las disoluciones son predominantemente viscosas.

## 5. Resultados y Discusión



**Figura 67.** Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) a 25 °C y b) propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia de los sistemas AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) a 25 °C.



**Figura 68.** Imágenes por microscopía (MEB) a escala de 1  $\mu\text{m}$  (magnificación  $\times 10\,000$ ) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) AC 17% y AC17%/proteína de biomasa del consorcio D, pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) a: b) 1.25%, c) 2.5% y d) 5% en peso.



## 5. Resultados y Discusión

Las imágenes de electrohilado nuevamente muestran las fibras electrohiladas presentan una gran cantidad de defectos, Figura 68. La cantidad de defectos en las fibras incrementó a medida que aumentó la concentración de proteína en el sistema y el diámetro de fibra disminuyó, las fibras se vuelven más homogéneas con la adición de proteína y la desviación del promedio disminuyó, Tabla 44. Esto se puede atribuir al incremento de la conductividad de la solución con el aumento en la concentración de proteína, lo que favorece que se produzcan fibras más delgadas.

**Tabla 44.** Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas AC 17%/proteínas del consorcio D, pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa), en función de la concentración.

Sistema	[AC/Proteína] %	Diámetro promedio (nm)
AC	17	122.02 ± 55.2
AC/ Ultra50	17/1.25	57.2 ± 29.3
AC/ Ultra50	17/2.5	65.2 ± 23.5
AC/ Ultra50	17/5	49.4 ± 24.9

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

De forma contraria que para las fibras electrohiladas con base en proteínas del consorcio D no pretratada, la cantidad y el tamaño de los agregados encontrados en las fibras electrohiladas con base en proteínas del consorcio D pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) se redujo con el incremento en la concentración de proteína. La Figura 40 de la sección 5.3.3 muestra que el punto isoeléctrico de las proteínas del consorcio D pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) es cercano a pH 4, por lo tanto la solubilidad de las proteínas en la solución de ácido acético al 80% debe incrementar en comparación con las proteína del consorcio D no pretratada, lo que favorece el proceso de electrohilado. Por otra parte, el pretratamiento de la biomasa también favorece la solubilidad de las proteínas, ya que como se comentó en la sección 5.3.2 el ultrasonido induce la disminución de su peso molecular. Otros aspectos que favorecen el proceso de electrohilado de proteína del consorcio D pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa) son: la disminución de la tensión superficial y el aumento de la conductividad a medida que incrementó la concentración de proteína en la solución, Tabla 43.

A pesar de que el proceso de electrohilado se llevó a cabo de forma más eficiente con proteína del consorcio D pretratada con ultrasonido (50 kWh/kg biomasa), las membranas que se obtuvieron carecían de las propiedades necesarias para llevar a cabo un ensayo de resistencia a la tracción.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.6.2.3 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema AC 17% /proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa)

La caracterización física de las soluciones AC/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg de biomasa) se muestran en la Tabla 45.

**Tabla 45.** Propiedades físicas de las soluciones AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg de biomasa) a 25 °C.

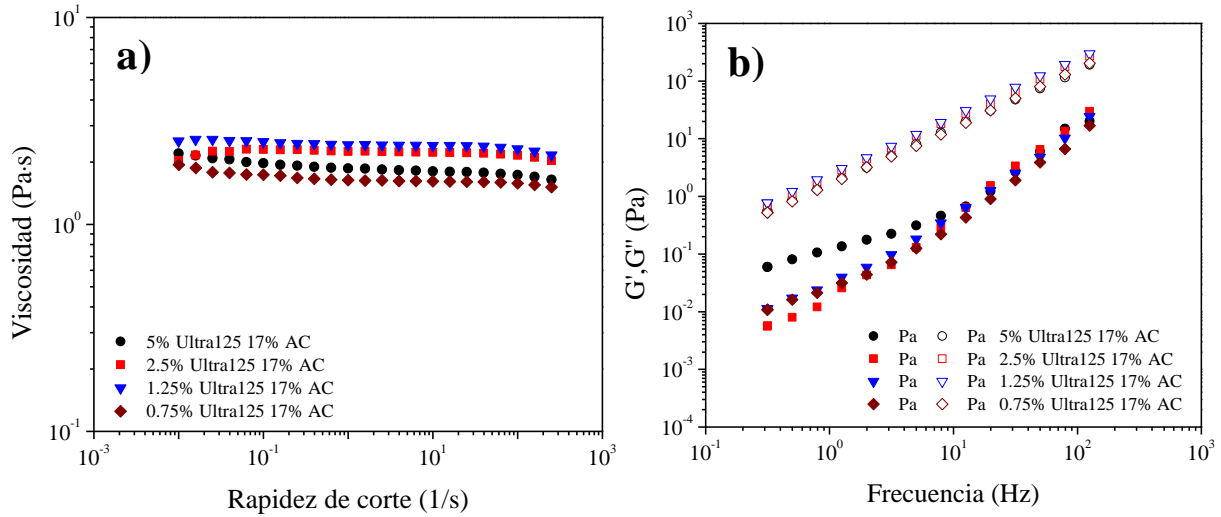
Muestra	[AC/Proteína] %	Tensión superficial (mN/cm)	Conductividad ( $\mu$ S/cm)	Viscosidad (Pa·s)
AC	[17]	34.38 $\pm$ 0.07	25.6	34.38
AC/Ultra125	[17/0.75]	33.28 $\pm$ 0.06	150	1.64 $\pm$ 0.12
AC/Ultra125	[17/1.25]	33.30 $\pm$ 0.09	582	2.37 $\pm$ 0.05
AC/Ultra125	[17/2.5]	31.80 $\pm$ 0.22	783	2.08 $\pm$ 0.18
AC/Ultra125	[17/5]	33.35 $\pm$ 0.08	723	1.87 $\pm$ 0.09

Los datos se muestran como media  $\pm$  DS, derivados de mediciones por triplicado.

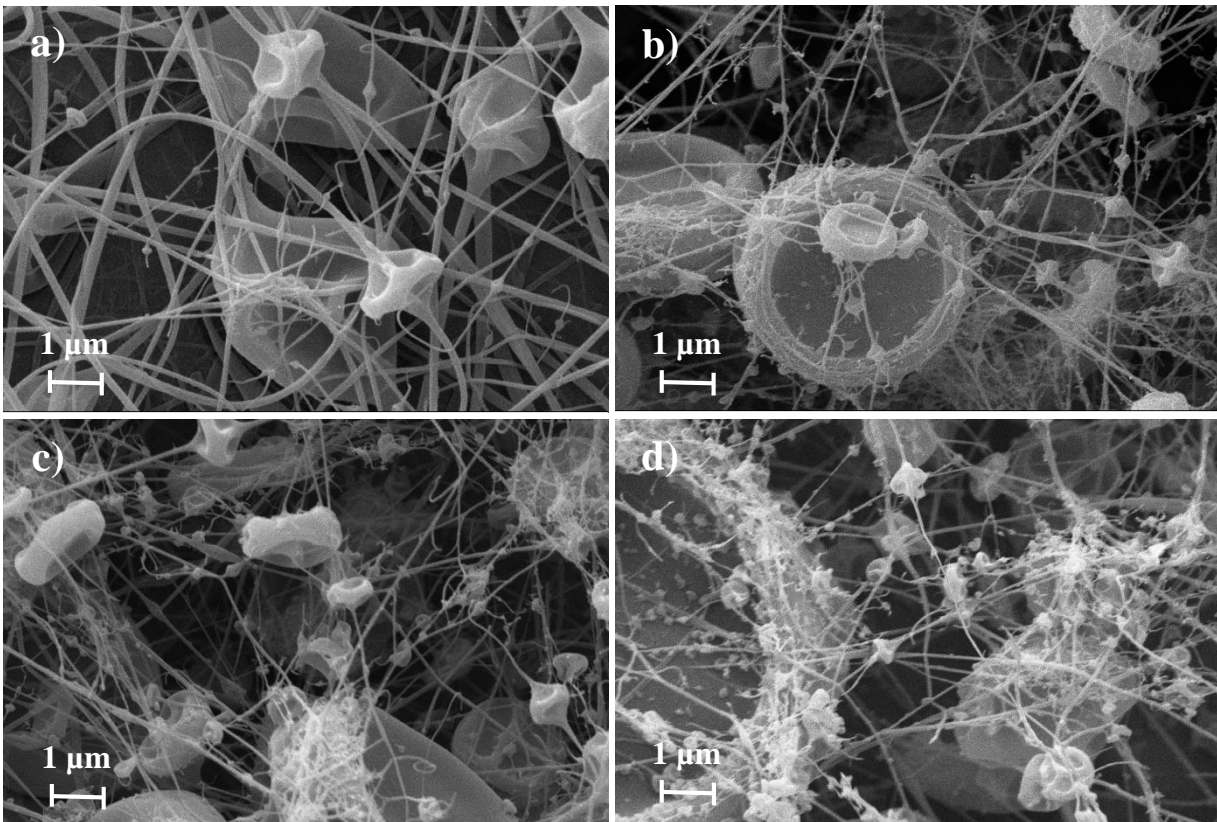
De igual forma que para la proteína de biomasa sin pretratar y pretratada con ultrasonido a 50 kWh/kg de biomasa), la adición de proteína de biomasa pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa) a la solución de acetato de celulosa, no muestra un efecto importante en la tensión superficial. La conductividad aumentó de forma considerable al añadir proteína al sistema y descende a medida que disminuye la concentración de proteína. La viscosidad de las soluciones a 10 s<sup>-1</sup> disminuye al añadir proteína de microalgas al sistema y a medida que disminuye la concentración de proteína. Los resultados que se presentan en la Figura 69a muestran nuevamente que las soluciones presentan un comportamiento newtoniano, ya que la viscosidad no depende de la rapidez de corte y se mantiene prácticamente constante.

El análisis mecánico dinámico para las soluciones de proteína se presenta en la Figura 69b. A medida que aumentó la concentración de proteína en los sistemas, aumentaron los módulos G' y G'', lo que conlleva a un aumento de la consistencia y reforzamiento de la solución. El módulo G'' es mayor que el módulo G', por lo que las disoluciones son predominantemente viscosas.

## 5. Resultados y Discusión



**Figura 69.** Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa) a 25 °C y b) propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia de los sistemas AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa) a 25 °C.



**Figura 70.** Imágenes por microscopia (MEB) a escala de 1 μm (magnificación x10 000) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) AC 17% y AC17%/ proteína del consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa) a: b) 1.25%, c) 2.5% y d) 5% en peso.

## 5. Resultados y Discusión

Las imágenes de electrohilado muestran que las fibras electrohiladas presentan una gran cantidad de defectos, Figura 70. Se observa la formación de agregados de proteína en la membrana a medida que incrementó la concentración de proteína en la solución. La Figura 40 de la sección 5.3.3 muestra que el punto isoeléctrico de las proteínas del consorcio D pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa) es cercano a pH 2, lo que promueve que la solubilidad de las proteínas en la solución de ácido acético al 80% sea baja, y favorece que las proteínas formen agregados. Por lo tanto, las membranas que se obtuvieron carecían de las propiedades necesarias para llevar a cabo un ensayo de resistencia a la tracción. La cantidad de defectos en las fibras incrementó a medida que aumentó la concentración de proteína en el sistema, el diámetro de fibra disminuyó y la desviación del promedio aumentó, Tabla 46. El adelgazamiento de las fibras se atribuye nuevamente al incremento de la conductividad de la solución con el aumento en la concentración de proteína.

**Tabla 46.** Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas AC 17%/proteínas del consorcio D, pretratada con ultrasonido (125 kWh/kg biomasa), en función de la concentración.

Sistema	[AC/Proteína] %	Diámetro promedio (nm)
AC	17	122.02 ± 55.2
AC/ Ultra125	17/1.25	46.2 ± 31.07
AC/ Ultra125	17/2.5	41.60 ± 19
AC/ Ultra125	17/5	45.4 ± 27.4

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

### 5.6.2.4 Obtención de membranas por electrohilado, a partir del sistema AC 17% /proteínas de biomasa del consorcio D pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L)

La caracterización física de las soluciones AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ozono a 9 mg O<sub>3</sub>/L se muestran en la Tabla 47.

**Tabla 47.** Propiedades físicas de los sistemas AC 17%/de proteína del consorcio D, pretratada con ozono a 9 mg O<sub>3</sub>/L y 25 °C.

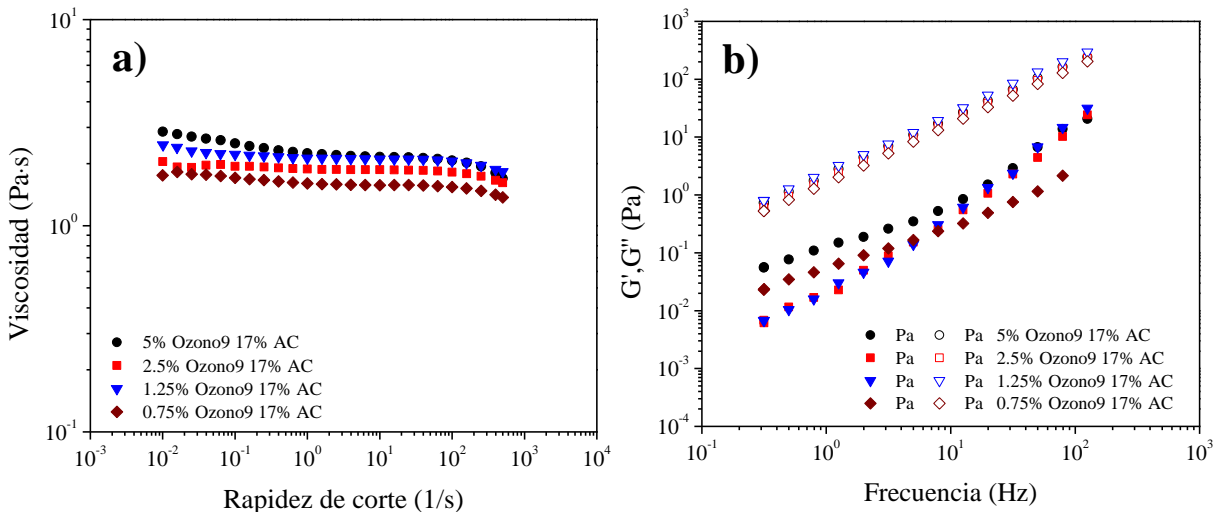
Muestra	[AC/Proteína] %	Tensión superficial (mN/cm)	Conductividad (μS/cm)	Viscosidad (Pas)
AC	[17]	34.38 ± 0.07	25.6	34.38
AC/Ozono9	[17/0.75]	33.40 ± 0.06	202	1.50 ± 0.10
AC/Ozono9	[17/1.25]	33.60 ± 0.10	444	2.32 ± 0.20
AC/Ozono9	[17/2.5]	33.54 ± 0.16	830	1.88 ± 0.08
AC/Ozono9	[17/5]	30.75 ± 0.18	3040	1.98 ± 0.26

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

## 5. Resultados y Discusión

La adición de proteína de biomasa pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L) a la solución de acetato de celulosa no muestra un efecto importante en la tensión superficial. No obstante, la conductividad aumentó de forma considerable al añadir proteína al sistema y desciende a medida que disminuye la concentración de proteína. El aumento en la conductividad de la solución es un orden de magnitud mayor que para el resto de las proteínas lo que puede mejorar el proceso de electrohilado. El incremento en la conductividad de la solución se puede explicar debido a la adición de grupos hidroxilo a la estructura de las proteínas durante el pretratamiento con ultrasonido. La viscosidad de las soluciones a 10 s<sup>-1</sup> disminuye al añadir proteína de microalgas al sistema y a medida que disminuye la concentración de proteína. Los resultados que se presentan en la Figura 71a, muestran una vez más que las soluciones presentan un comportamiento newtoniano ya que la viscosidad no depende de la rapidez de corte y se mantiene prácticamente constante.

El ensayo oscilatorio para las soluciones de proteína se presenta en la Figura 71b. A medida que aumentó la concentración de proteína en los sistemas, aumentaron los módulos G' y G'' y por lo tanto aumentó la consistencia y reforzamiento de la solución. El modulo G'' es mayor que el modulo G', por lo que las disoluciones son predominantemente viscosas. En general los ensayos oscilatorios de los sistemas AC/proteína del consorcio D muestran que la pendiente de los módulos obtenidos en el ensayo es significativa, por lo tanto, existe una dependencia de los módulos elástico y viscoso con la frecuencia.

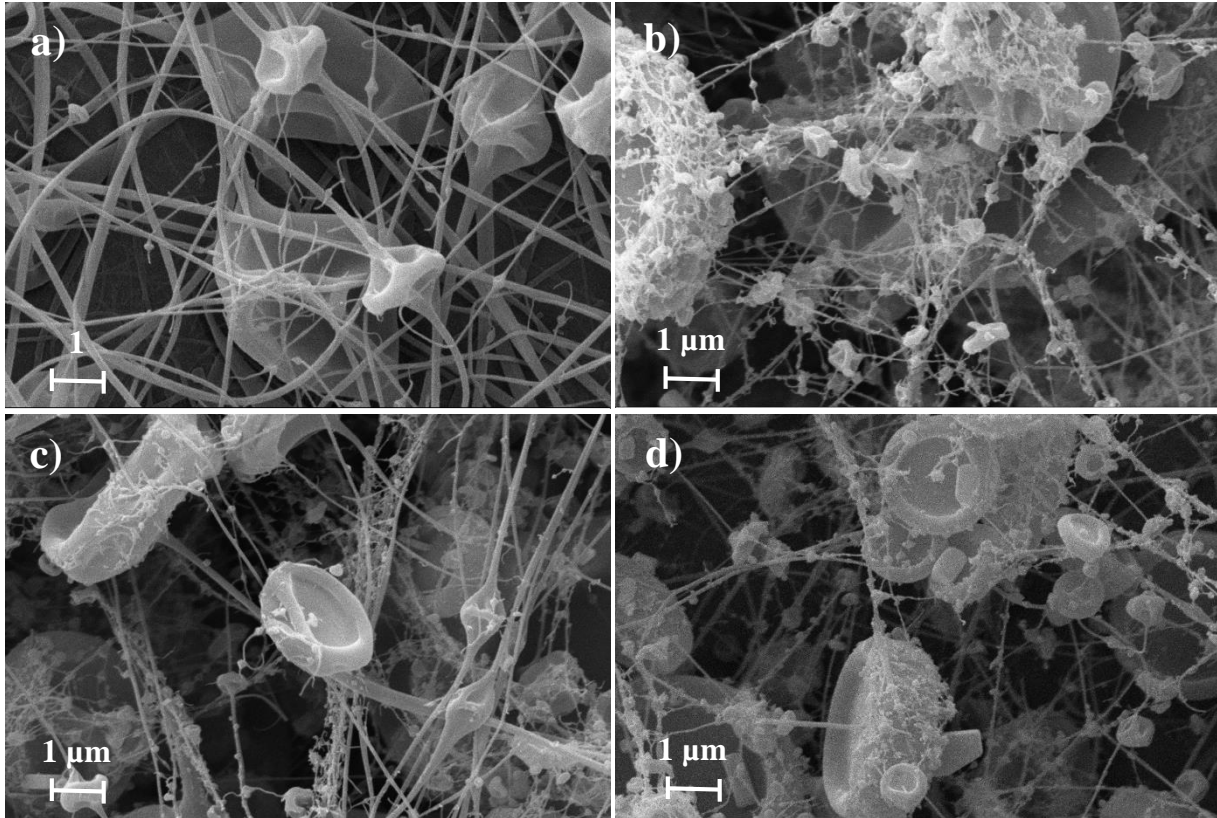


**Figura 71.** Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L) a 25 °C y b) propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia de los sistemas AC 17%/proteína del consorcio D, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L) a 25 °C.

El proceso de pretratamiento con ozono de la biomasa del consorcio D indujo que los agregados formados durante el proceso de electrohilado sean de menor tamaño en comparación a los que se forman cuando la biomasa fue pretratada con ultrasonido, Figura 72. Esto se atribuye a que, como se mencionó en la sección 5.3.2, el pretratamiento de la biomasa de microalgas con ozono promueve la disminución del peso molecular de las proteínas en mayor medida que el pretratamiento con ultrasonido. La disminución del peso molecular de las proteínas debe incrementar su solubilidad pero el punto isoeléctrico de las proteínas del consorcio D pretratada

## 5. Resultados y Discusión

con ozono es cercano a pH 3. Por lo tanto, la solubilidad de las proteínas en ácido acético al 80% debe ser mínima. Esto favorece que durante el proceso de electrohilado se formen pequeños agregados, ya que las proteínas tienen bajo peso molecular pero son poco solubles en ácido acético al 80%.



**Figura 72.** Imágenes de microscopia (MEB) a escala de 1  $\mu\text{m}$  (magnificación  $\times 10\,000$ ) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) AC 17% y AC 17%/ proteína del consorcio D, pretratada con ozono (9 mg  $\text{O}_3/\text{L}$ ) a: b) 1.25%, c) 2.5%, y d) 5% en peso.

Durante el proceso de electrohilado de las proteínas del consorcio D pretratada con ozono la cantidad de defectos incrementó a medida que aumentó la concentración de proteína en el sistema. Por otra parte, el diámetro de fibra disminuyó con el aumento en la concentración de proteína, las fibras se vuelven más homogéneas y la desviación del promedio disminuyó, Tabla 48. El adelgazamiento de las fibras se atribuye al considerable incremento de la conductividad de la solución con el aumento en la concentración de proteína en la solución.

Ninguna de las fibras de electrohilado que se obtuvieron a partir de los sistemas AC/proteína del consorcio D presentó las propiedades necesarias para llevar a cabo un ensayo de tracción.

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 48.** Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas AC 17%/proteínas del consorcio D, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L), en función de la concentración.

Sistema	[AC/Proteína] %	Diámetro promedio (nm)
AC	17	122.02 ± 55.2
AC/Ozono9	17/0.75	46.06 ± 24
AC/Ozono9	17/1.25	51.66 ± 27.5
AC/Ozono9	17/2.5	41.7 ± 18.5
AC/Ozono9	17/5	47.5 ± 19.2

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

### 5.7 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de proteínas de biomasa del consorcio S

#### 5.7.1 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de proteínas de biomasa del consorcio S en solución

Para obtener membranas con base en proteínas de biomasa del consorcio S, el acetato de celulosa se sustituyó por poli (óxido de etileno) (PEO). El PEO es uno de los polímeros con mayor capacidad electrolítica, ya que es soluble en agua y la mayoría de los solventes orgánicos. Por lo tanto, el pH de la solución a electrohilar dependerá de la solubilidad de las proteínas y no del polímero. Esto garantiza que las proteínas en solución se encuentren en un ambiente más propicio para llevar a cabo el proceso de electrohilado. Además, el PEO es un producto no tóxico, totalmente biodegradable y presenta alta biocompatibilidad. Debido a esto, durante las últimas décadas, el PEO ha sido utilizado para desarrollar membranas de liberación controlada de fármacos y con aplicaciones de ingeniería de tejidos [310].

A pesar de que las proteínas de biomasa del consorcio D no fueron electrohiladas con éxito, es necesario realizar un estudio de electrohilado de las proteínas del consorcio S, para evaluar su capacidad de electrohilado, además de evaluar el efecto del pretratamiento en las propiedades físicas de las proteínas y determinar si el pretratamiento aplicado favorece la formación de membranas por electrohilado de proteínas puras. Para obtener las soluciones a electrohilar, los concentrados de proteína del consorcio S se disolvieron en buffer Tris base a pH 8.94. El estudio de solubilidad de la sección 5.3.3 muestra que, a pH 8.94, las proteínas del consorcio S son solubles entre un 30% y un 60%, dependiendo del pretratamiento aplicado. El estudio de la capacidad de electrohilado de las proteínas del consorcio S se llevó a cabo a partir de soluciones de concentración 2.5% y 5%, en peso para todas las muestras. El blanco del estudio fue una solución de PEO al 3.5% en peso, Tabla 49.

A pesar de que en este caso la concentración de proteínas no es la misma para todas las soluciones, tanto la densidad como la tensión superficial permanecieron casi constantes. Las disoluciones de proteína presentaron conductividad dos órdenes de magnitud mayor, en comparación con la

## 5. Resultados y Discusión

solución de PEO, lo que puede favorecer considerablemente el proceso de electrohilado. Sin embargo, la viscosidad, que es un factor muy importante en el proceso de electrohilado, es entre dos y tres órdenes de magnitud menor en comparación con la solución de PEO. Se ha demostrado que un rango de viscosidad entre 0.1 y 21.5 Pa·s es adecuado para la producción de nanofibras uniformes por electrohilado [311]. Para soluciones de baja viscosidad como las que se obtuvieron, la tensión superficial es el factor dominante durante el proceso de electrohilado y solo se forman fibras por electrohilado por arriba de una concentración crítica [312].

**Tabla 49.** Propiedades físicas de las soluciones de proteína del consorcio S en Tris base (pH 8.94) 2.5% y 5% en peso.

<b>Pretratamiento</b>	<b>[P] %</b>	<b>Tensión superficial (mN/cm)</b>	<b>Conductividad (<math>\mu</math>S/cm)</b>	<b>Densidad (gr/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Viscosidad (Pa·s)</b>
<b>PEO</b>	3.5	46.11 $\pm$ 0.16	109.1	1.00	0.44 $\pm$ 0.03
<b>Sin pretratamiento</b>	2.5	36.46 $\pm$ 0.06	39300	1.03	0.011
<b>Sin pretratamiento</b>	5	36.59 $\pm$ 0.08	65500	1.07	0.220
<b>Ultrasonido (200 kWh/kg biomasa)</b>	2.5	38.59 $\pm$ 0.02	13090	1.01	0.006
<b>Ultrasonido (200 kWh/kg biomasa)</b>	5	36.86 $\pm$ 0.04	24300	1.02	0.008
<b>Ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L)</b>	2.5	38.78 $\pm$ 0.08	20300	1.02	0.005
<b>Ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L)</b>	5	38.62 $\pm$ 0.12	38900	1.04	0.039

Los datos se muestran como media  $\pm$  DS, derivados de mediciones por triplicado.

En la Tabla 50 se muestran las propiedades viscoelásticas en función de la frecuencia (1 Hz) para las soluciones de proteína del consorcio S en Tris base al 2.5% y 5%. En la tabla se observa que el módulo viscoso, G'', es notablemente menor que el módulo elástico, G', por lo tanto, la solución tiene un comportamiento elástico.



## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 50.** Propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia (1Hz) de las soluciones de proteína del consorcio S en Tris base (pH 8.94) al 2.5% y 5% en peso.

Muestra	[P] %	G' (Pa)	G'' (Pa)	tan $\delta$	Viscosidad (Pa·s)
Sin pretratamiento	2.5	0.002	0.015	7.4	0.008
Sin pretratamiento	5	0.101	0.159	1.57	0.059
Ultrasonido (200 kWh/kg biomasa seca)	2.5	0.001	0.012	12	0.005
Ultrasonido (200 kWh/kg biomasa seca)	5	0.014	0.048	3.43	0.022
Ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L)	2.5	0.004	0.012	3	0.005
Ozono (9 mg O <sub>3</sub> /L)	5	0.012	0.048	4	0.018

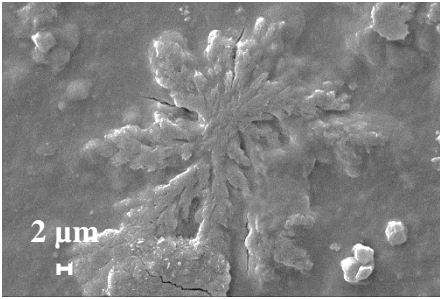
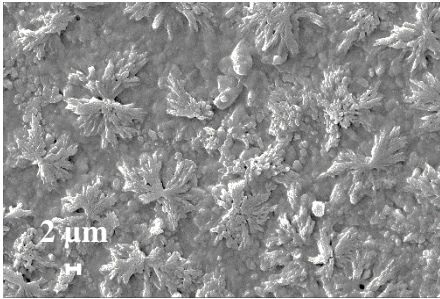
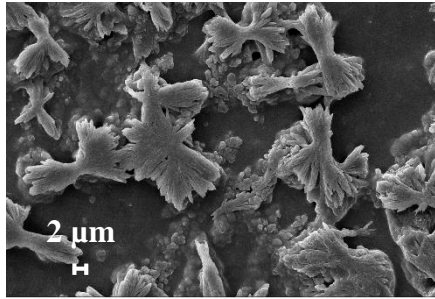
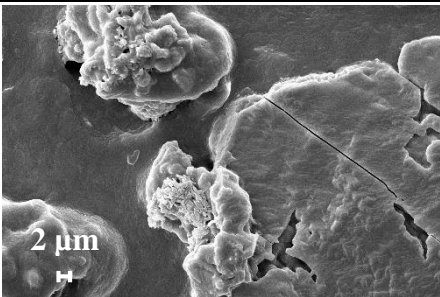
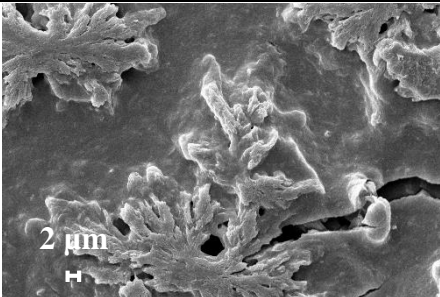
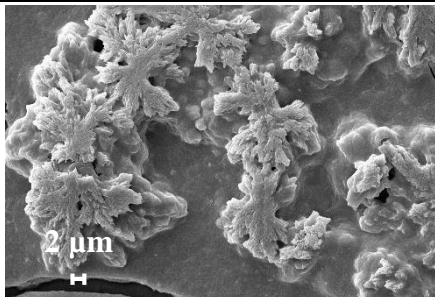
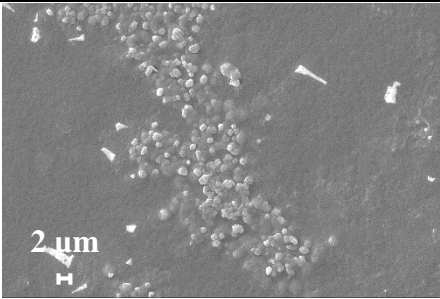
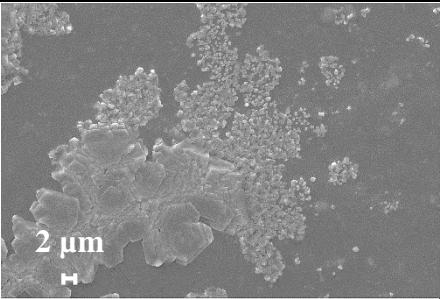
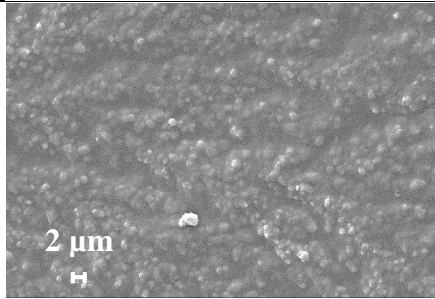
El proceso de electrohilado se llevó a cabo utilizando parámetros de referencia. Es decir, con caudal de salida de 0.4 mL/h, distancia entre la aguja y el capilar de 12 cm y un colector plano. Sin embargo, se estudió el efecto de la diferencia de potencial eléctrico en la formación de fibras de electrohilado. Los valores de potencial eléctrico estudiados fueron 9, 2 y 15 kV. En todos los procesos de electrohilado se tuvo en cuenta que la humedad relativa fuera menor del 50%.

Ninguna de las soluciones de proteína del consorcio S estudiadas mostró las características necesarias para obtener una membrana de electrohilado. Las proteínas del consorcio S no mostraron propiedades viscoelásticas esenciales para un electrohilado estable. Las imágenes que se obtuvieron del estudio de microscopía muestran que se formó un electrosreado, ya que la proteína se proyectó sin formar nanofibras, por lo tanto, no se puede medir ninguna propiedad, Tablas 51 y 52.

Los valores de potencial eléctrico estudiados no mostraron un efecto concreto en la formación de electroesreados.

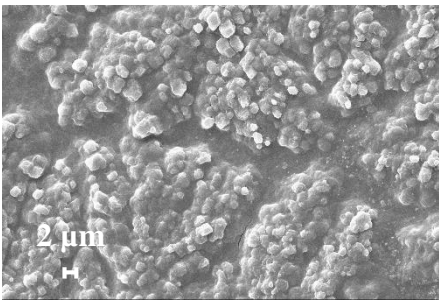
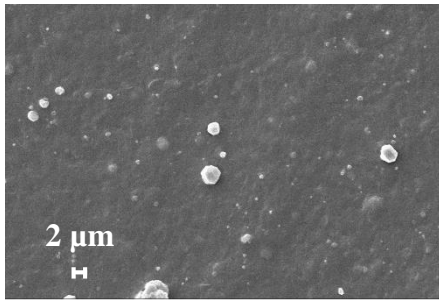
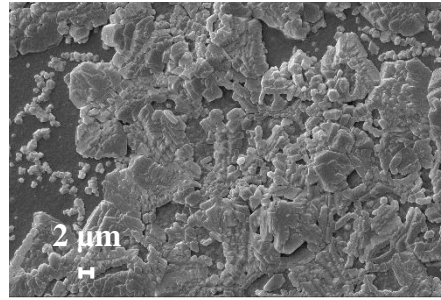
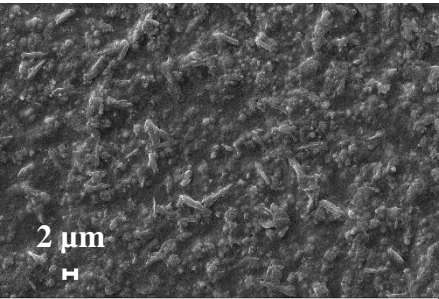
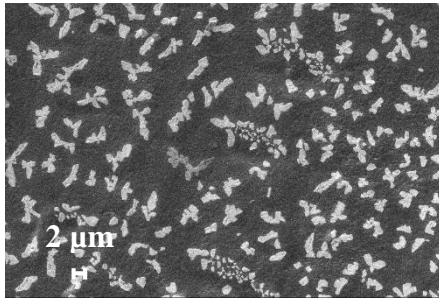
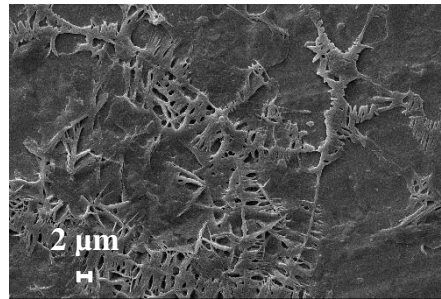
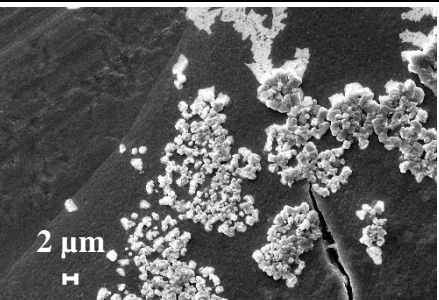
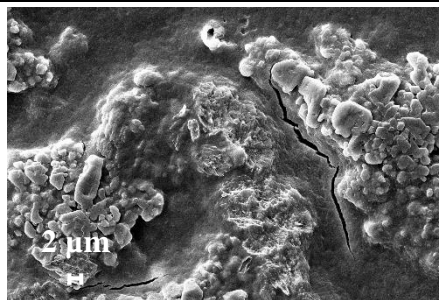
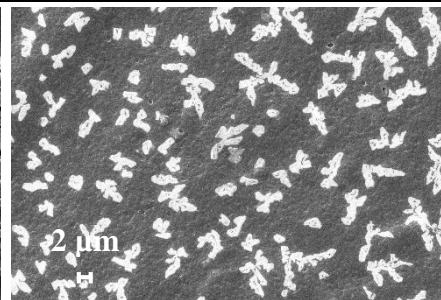
## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 51.** Imágenes por microscopia (MEB) de los electrospreads de proteína del consorcio S disueltas en Tris base a 2.5 y 5% en peso y potencial eléctrico de 9, 12 y 15 kV, (magnificación x2 000).

Proteína/Voltaje	9 kV	12 kV	15 kV
<b>Sin pretratamiento 2.5%</b>			
<b>Sin pretratamiento 5%</b>			
<b>Ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) 2.5%</b>			

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 52.** Imágenes por microscopia (MEB) de los electrospreads de proteína del consorcio S a escala de 2 disueltas en Tris base a 2.5 y 5% en peso y potencial eléctrico de 9, 12 y 15 kV, (magnificación x2 000).

Proteína/Voltaje	9 kV	12 kV	15 kV
<b>Ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) 5%</b>			
<b>Ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L) 2.5%</b>			
<b>Ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L) 5%</b>			

**5.7.2 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de los sistemas PEO 3.5 %/proteínas de biomasa del consorcio S**

**5.7.2.1 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de los sistemas PEO 3.5 %/proteínas de biomasa del consorcio S sin pretratamiento**

Debido a que no fue posible obtener membranas por electrohilado a partir de soluciones de proteína de microalga, se optó por un sistema de dos componentes. El sistema estudiado fue PEO 3.5%/proteína de microalgas. Adicionalmente se estudió el efecto del pretratamiento aplicado a la biomasa, para llevar a cabo la extracción de proteínas durante el proceso de electrohilado y el efecto de la concentración de proteína. Las concentraciones de proteínas estudiadas fueron 2.5%, 1.25% y 0.75% en peso. Los resultados se presentan con base al pretratamiento aplicado. La caracterización física de las soluciones PEO 3.5%/proteína del consorcio S sin pretratamiento se muestran en la Tabla 53.

**Tabla 53.** Propiedades físicas de los sistemas PEO 3.5%/proteína de biomasa del consorcio S no pretratada.

Pretratamiento	[PEO/P] %	Tensión superficial (mN/cm)	Conductividad ( $\mu$ S/cm)	Densidad (gr/cm <sup>3</sup> )	Viscosidad (Pas)
<b>PEO</b>	3.5	46.11 $\pm$ 0.16	109.1	1.002	0.44 $\pm$ 0.03
<b>Sin pretratamiento</b>	3.5/0.75	39.14 $\pm$ 0.14	6430	1.013	0.63 $\pm$ 0.009
<b>Sin pretratamiento</b>	3.5/1.25	38.32 $\pm$ 0.11	13680	1.020	0.64 $\pm$ 0.007
<b>Sin pretratamiento</b>	3.5/2.5	37.37 $\pm$ 0.08	23400	1.035	0.67 $\pm$ 0.09

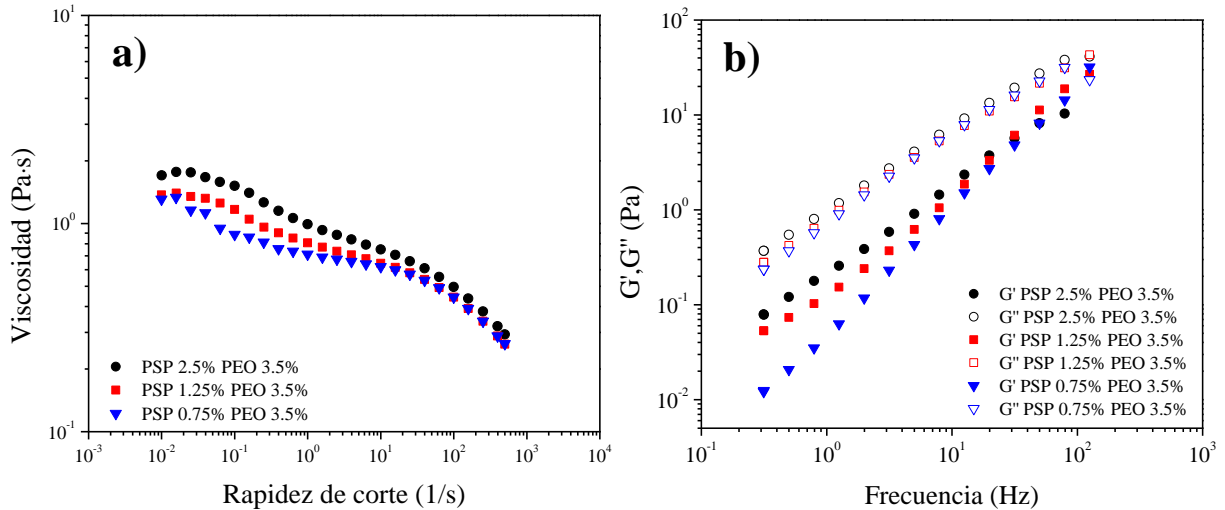
Los datos se muestran como media  $\pm$  DS, derivados de mediciones por triplicado.

La adición de proteína de biomasa del consorcio S sin pretratamiento a la solución de PEO favorece la disminución de la tensión superficial y no muestra un efecto en la densidad de las soluciones. La conductividad incrementó de forma considerable al añadir proteína al sistema y desciende a medida que disminuye la concentración de proteína. El aumento en la conductividad de la solución es entre uno y dos órdenes de magnitud mayor que para el PEO, lo que puede mejorar el proceso de electrohilado. La viscosidad de las soluciones a 10 s<sup>-1</sup> aumentó al añadir proteína de microalgas al sistema y disminuye a medida que disminuye la concentración de proteína. Este resultado está relacionado con formación de interacciones entre la proteína y el polímero sintético, posiblemente de carácter polar [310]. En la Figura 73a se muestran la gráfica de viscosidad frente a la rapidez de corte para el sistema en cuestión. Se puede observar que la viscosidad fue dependiente de la rapidez de corte, ya que disminuye a medida que aumentó la rapidez de corte.

La Figura 73b muestra que el aumento en la concentración de proteína en los sistemas favorece la disminución de los módulos G' y G". Esto sugiere que el incremento en la concentración de

## 5. Resultados y Discusión

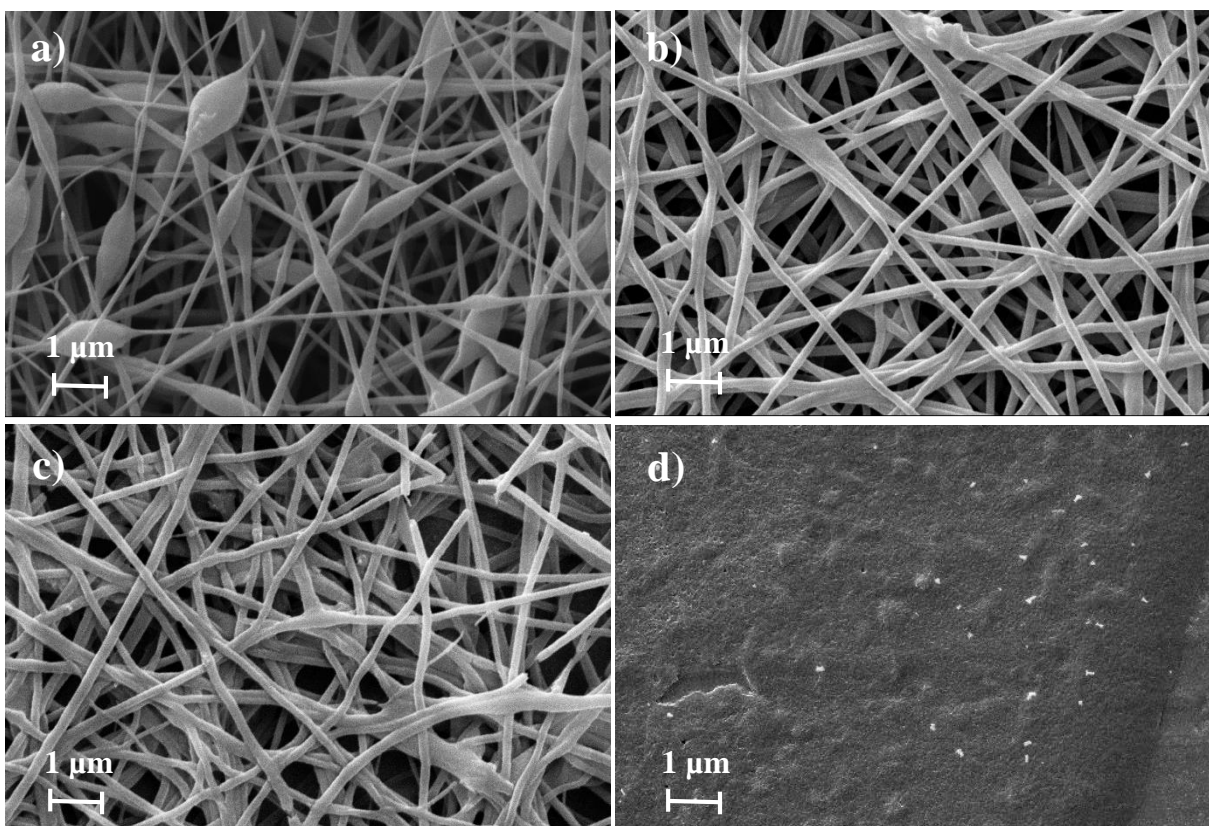
proteína, proporciona menor consistencia a la disolución. Esto concuerda con la disminución en la tensión superficial. Con respecto a los valores del módulo elástico y el módulo viscoso, el módulo viscoso supera notablemente al módulo elástico en todos los sistemas. Por lo tanto, las disoluciones son predominantemente viscosas. Existe una dependencia de los módulos elástico y viscoso con la frecuencia ya que la pendiente de los módulos es significativa.



**Figura 73.** Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S sin pretratar a 25 °C y b) propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia de los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S sin pretratar a 25 °C.

El proceso de electrohilado para todos los sistemas de dos componentes se llevó a cabo utilizando parámetros de referencia. Es decir, caudal de salida de 0.4 mL/h, potencial eléctrico de 10 kV, distancia entre la aguja y el capilar de 12 cm y un colector plano. En todos los procesos de electrohilado se tuvo en cuenta que la humedad relativa fuera menor del 50%, llegando a no realizarse el proceso a humedades mayores.

La microestructura de las membranas obtenidas por electrohilado se evaluó mediante imágenes de microscopía (MEB), Figura 74. La membrana que se obtuvo a partir de la solución de PEO 3.5% fue tomada como el blanco. Se puede observar que esta membrana tiene una gran cantidad de defectos. Cuando se añade proteína del consorcio S los defectos desaparecen. Sin embargo, no fue posible electrohilar la solución que contiene la concentración de proteína más alta (2.5%). Esto se puede atribuir al drástico aumento de la conductividad de la solución al 2.5% en peso de proteína del consorcio S. Durante el proceso de electrohilado, el incremento de la conductividad eléctrica de la solución generalmente produce una significativa disminución en el diámetro de las nanofibras electrohiladas. Hayati y colaboradores [313] demostraron que las soluciones altamente conductoras son extremadamente inestables en la presencia de fuertes campos eléctricos, lo que resulta en una curvatura inestable.



**Figura 74.** Imágenes por microscopía (MEB) a escala de 1  $\mu\text{m}$  (magnificación  $\times 10\,000$ ) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) PEO 3.5% y PEO 3.5%/ proteína del consorcio S sin pretratamiento a: b) 0.75%, (c) 1.25% y d) 2.5% en peso.

**Tabla 54.** Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas PEO 3.5%/proteínas del consorcio S sin pretratamiento, en función de la concentración.

Sistema	[PEO/P] %	Diámetro promedio (nm)
PEO	3.5	$255.14 \pm 127.56$
PEO/Sin pretratamiento	3.5/0.75	$196.05 \pm 0.14$
PEO/Sin pretratamiento	3.5/1.25	$343.65 \pm 159.09$

Los datos se muestran como media  $\pm$  DS, derivados de mediciones por triplicado.

En la Tabla 54 se muestra el diámetro medio de las nanofibras, los resultados muestran que al aumentar la concentración de proteína en la solución, las fibras se vuelven más heterogéneas, con diámetros mucho menos uniformes, lo que deriva en una desviación estándar más alta. Durante el proceso de electrohilado, el flujo extensional del filamento transforma las macromoléculas plegadas de polímero de la disolución en una estructura entrelazada, orientada, que persiste al solidificar las fibras. El proceso requiere cierto grado de entrelazamientos (y por tanto de concentración) para superar la tensión superficial y estabilizar el filamento. Por arriba de la concentración crítica, las fuerzas viscoelásticas ofrecen la resistencia necesaria para evitar los rápidos cambios de forma de las fibras, aportando la uniformidad deseada. Sin embargo, a altas

## 5. Resultados y Discusión

concentraciones, la formación de fibras continuas se vuelve difícil, debido a la incapacidad del sistema de mantener el flujo de la solución en la punta de la aguja, dando como resultado la formación de fibras más grandes [314].

Finalmente se llevó a cabo una caracterización reológica de las membranas constituidas por nanofibras de PEO/proteína del consorcio S obtenidas mediante electrohilado, para comprobar su viabilidad para diferentes aplicaciones. Para llevar a cabo este estudio es necesario utilizar un espesor de muestra de membrana mínimo de 0.1 mm que, además, debe de ser lo suficientemente uniforme para evitar que se produzcan fallos del material durante los ensayos. En el caso de los sistemas estudiados, uno de los principales problemas encontrados fue conseguir la uniformidad adecuada después de separar la membrana del soporte de papel aluminio que cubría la placa metálica del colector. Teniendo en cuenta estas dificultades, solo fue posible caracterizar el sistema PEO 3.5%/proteína del consorcio S sin pretratamiento 0.75%.

El primer ensayo que se llevó a cabo fue un ensayo de tracción dinámica no destructivo, para conseguir una deformación elongación a una determinada frecuencia, Tabla 55.

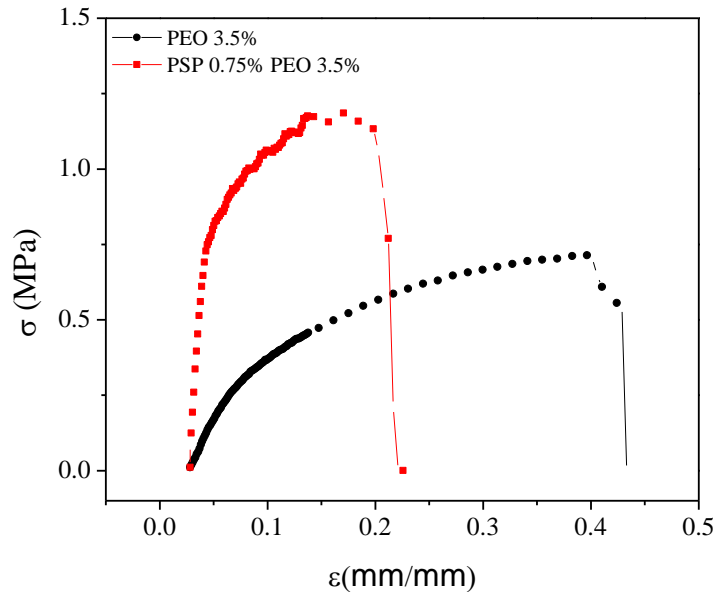
**Tabla 55.** Propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia (1Hz) de los sistemas PEO 3.5/proteína del consorcio S sin pretratamiento.

Sistema	[PEO/P] %	G' (Pa)	G'' (Pa)	tan $\delta$
PEO	3.5	$2.79 \times 10^7$	$1.36 \times 10^5$	0.0078
PEO/Sin pretratamiento	3.5/0.75	$1.17 \times 10^8$	$1.74 \times 10^7$	0.120

Los resultados muestran un comportamiento típico de una película viscoelástica sólida en la que el módulo elástico es superior al viscoso en dos órdenes de magnitud. Ambos módulos se mantienen baja dependencia con la frecuencia, en especial el modulo elástico. La adición de proteína del consorcio S sin pretratamiento mejoró las propiedades viscoelásticos de la membrana. El valor del módulo elástico, en torno a  $10^8$  para el sistema con proteína a 0.75%, constituye un reflejo de las buenas características mecánicas de esta membrana. Además, la tangente de pérdidas (tan  $\delta$ ) también indica el claro predominio de la repuesta elástica sobre la viscosa.

El segundo ensayo utilizado fue un ensayo de tracción para obtener la curva de esfuerzo-deformación, Figura 75. La adición de proteína del consorcio S no pretratada incrementó considerablemente el esfuerzo máximo de la nanofibra, ya que existe una pronunciada pendiente inicial que corresponde a la zona elástica lineal y se extiende hasta una deformación ligeramente mayor del 5%. La pendiente de esta zona es la que corresponde con el módulo elástico o de Young que, como se muestra en la Tabla 56, incrementó 6 veces su valor cuando se añade la proteína del consorcio S no pretratada en 0.75%. Sin embargo, la deformación a la rotura disminuyó casi la mitad de su valor inicial con respecto al blanco. Esto sugiere que la proteína y el PEO formaron interacciones importantes que ocasionaron el aumento del esfuerzo máximo de la nanofibra. No obstante, estas fuertes interacciones también ocasionaron que la nanofibra fuera más frágil.

## 5. Resultados y Discusión



**Figura 75.** Ensayo de tracción para los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S sin pretratamiento.

**Tabla 56.** Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo ( $\sigma_{\max}$ ) y deformación a la rotura ( $\epsilon_r$ ) para los sistemas: PEO 3.5%/proteína del consorcio S sin pretratamiento.

Sistema	[PEO/P] %	Módulo de Young (MPa)	$\sigma_{\max}$ (MPa)	$\epsilon_r$ (%)
PEO	3.5	$8.33 \pm 0.10$	$0.79 \pm 0.08$	$0.42 \pm 0.02$
PEO/Sin pretratamiento	3.5/0.75	$49.05 \pm 0.99$	$1.13 \pm 0.05$	$0.26 \pm 0.03$

Los datos se muestran como media  $\pm$  DS, derivados de mediciones por triplicado.

### 5.7.2.2 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de los sistemas PEO 3.5 %/proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg)

La caracterización física de las soluciones PEO 3.5%/proteína del consorcio S pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) se muestran en la Tabla 57. La adición de proteína del consorcio S pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) a la solución de PEO ocasionó disminución en la tensión superficial. Durante el proceso de electrohilado, la intensidad del campo eléctrico se debe incrementar hasta alcanzar el equilibrio entre las fuerzas electrostáticas, lo que provoca un valor de tensión superficial en el líquido que hace que la gota se alargue conduciendo a la formación del cono de Taylor. Una vez formado éste, la fuerza del campo eléctrico supera a las fuerzas de cohesión de la disolución, que en la mayoría de los casos son dominadas por la tensión superficial, y el polímero diluido inicia un camino que va desde la punta del capilar hasta el colector [315]. Por lo tanto, la disminución en la tensión superficial podría ayudar a que ocurra el proceso de electrohilado. Por otra parte, la conductividad aumentó una orden de magnitud al añadir proteína al sistema y desciende a medida que disminuye la concentración de proteína. La densidad de la solución permanece prácticamente constante y la viscosidad de las soluciones a  $10 \text{ s}^{-1}$  aumentó al añadir proteína de microalgas al sistema.



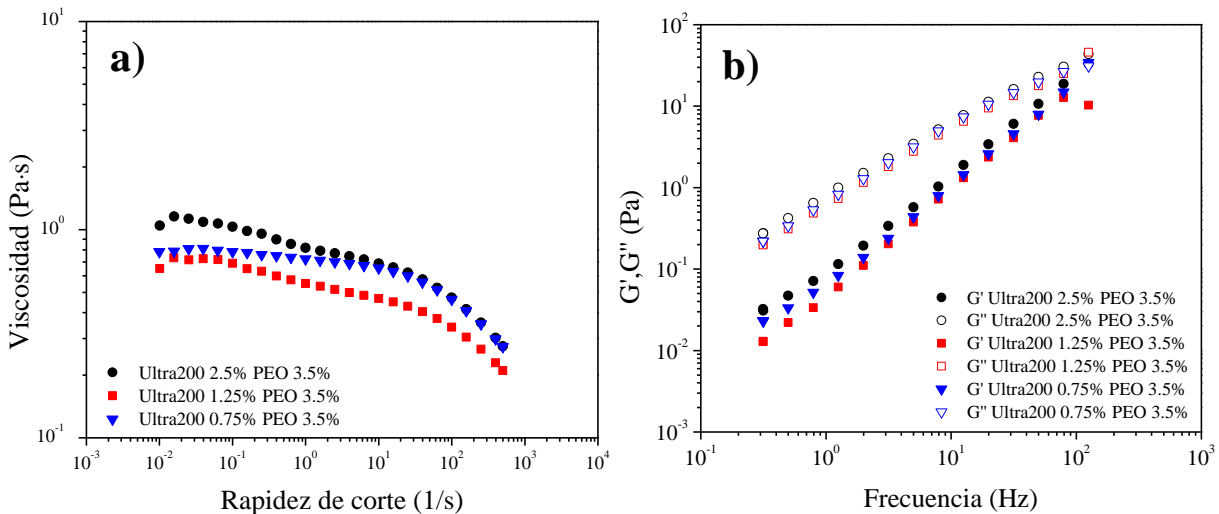
## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 57.** Propiedades físicas de los sistemas PEO 3.5%/proteína de biomasa del consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/gr biomasa).

Sistema	[PEO/P] %	Tensión superficial (mN/cm)	Conductividad ( $\mu\text{S/cm}$ )	Densidad ( $\text{gr/cm}^3$ )	Viscosidad ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ )
PEO	3.5	$46.11 \pm 0.16$	109.1	1.002	$0.44 \pm 0.03$
PEO/Ultra200	3.5/0.75	$39.77 \pm 0.08$	2210	1.007	$0.61 \pm 0.04$
PEO/Ultra200	3.5/1.25	$39.27 \pm 0.06$	4100	1.008	$0.49 \pm 0.03$
PEO/Ultra200	3.5/2.5	$39.78 \pm 0.07$	4830	1.011	$0.68 \pm 0.004$

Los datos se muestran como media  $\pm$  DS, derivados de mediciones por triplicado.

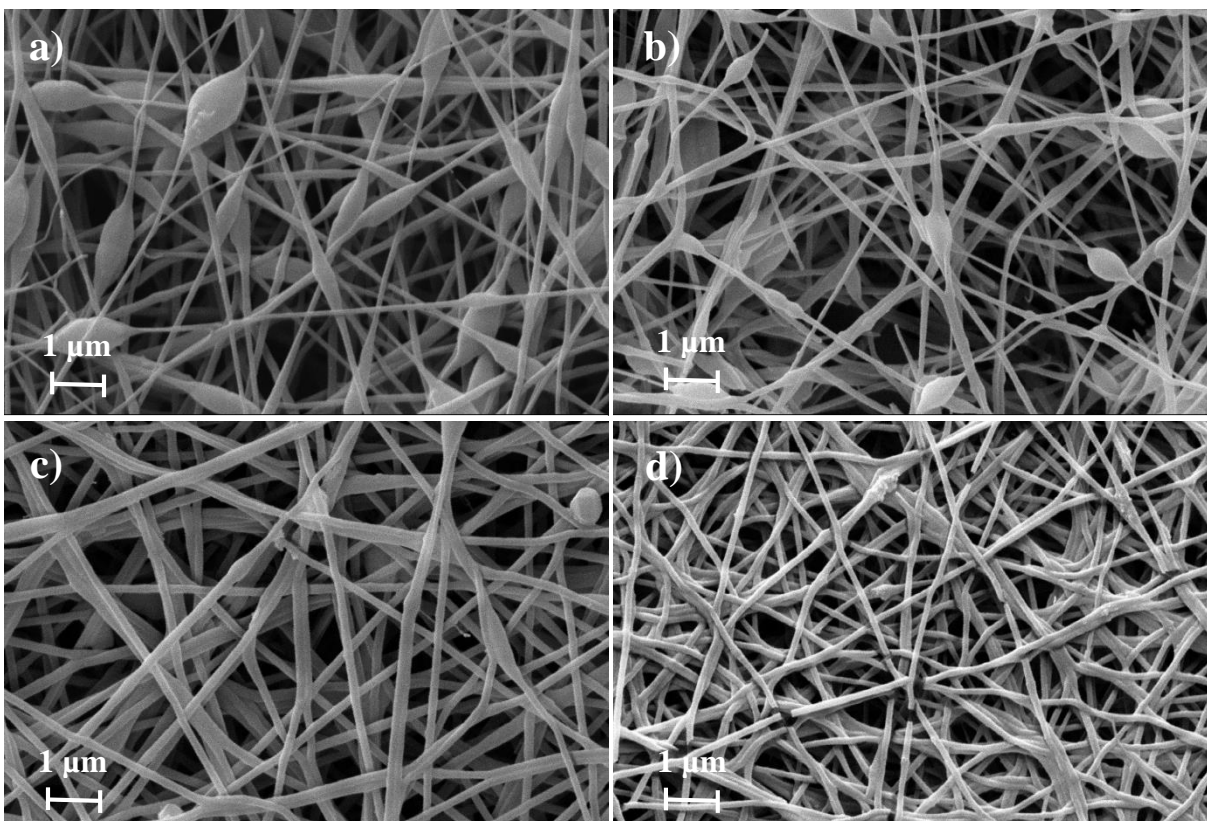
En la Figura 76a se muestran la gráfica de viscosidad frente a la rapidez de corte para el sistema en cuestión. Se puede observar que la viscosidad fue dependiente de la rapidez de corte, ya que disminuyó a medida que aumentó la rapidez de corte. La viscosidad también mostró dependencia de la concentración de proteína añadida. Lo que puede sugerir nuevamente la formación de interacciones de tipo polar entre el PEO y la proteína del consorcio S pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa).



**Figura 76.** Gráfica de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) a 25 °C y b) propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia de los sistemas PEO 3.5%/proteína pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) a 25 °C.

La Figura 76b muestra que el aumento en la concentración de proteína en los sistemas favorece la disminución de los módulos  $G'$  y  $G''$ . Nuevamente, el incremento en la concentración de proteína primero disminuye la consistencia de la solución. Sin embargo, cuando la concentración de proteína aumentó a 2.5% induce un aumento en los módulos viscoelásticos. La disminución en la viscosidad y propiedades viscoelásticas de la solución puede llegar a favorecer el proceso de

electrohilado. Las disoluciones estudiadas son predominantemente viscosas, ya que el módulo viscoso supera notablemente al módulo elástico en todos los sistemas.



**Figura 77.** Imágenes de microscopía (MEB) a escala de 1  $\mu\text{m}$  (magnificación  $\times 10\,000$ ) de las membranas por electrohilado de los sistemas a) PEO 3.5% y PEO 3.5%/ proteína del consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) a: b) 0.75%, c) 1.25% y d) 2.5% en peso.

La microestructura de las membranas obtenidas por electrohilado se evaluó mediante imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB), Figura 77. Cuando se añade proteína del consorcio S, la cantidad de defectos disminuye. Cuando la concentración de proteína en la solución aumentó de 0.75% a 1.25%, los defectos desaparecen y las fibras comienzan a mostrar mayor homogeneidad. Finalmente, las membranas que se obtienen a partir de la solución de proteína con la mayor concentración de proteína (2.5%) muestran una estructura más homogénea y compacta.

En la Tabla 58 se muestra el diámetro medio de las nanofibras, así como sus desviaciones típicas. La tabla muestra que el aumento de la concentración de proteína en la solución produce un incremento en la homogeneidad de las fibras, con diámetros más uniformes, lo que deriva en una disminución de la desviación estándar. Esto concuerda con la disminución de la tensión superficial, ya que durante el proceso de electrohilado, las fuerzas viscoelásticas ofrecen la resistencia necesaria para evitar los rápidos cambios de forma de las fibras aportando la uniformidad deseada [316]. Si la tensión de las fuerzas viscoelásticas disminuye, como se observa en la Figura 76b, el proceso de electrohilado se vuelve más fácil. Básicamente, la tensión superficial determina los límites superior e inferior de la ventana de electrohilado, si todas las demás variables se mantienen constantes.

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 58.** Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas PEO 3.5%/proteínas del consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg), en función de la concentración.

Sistema	[PEO/P] %	Diámetro promedio (nm)
PEO	3.5	255.14 ± 127.56
PEO/Ultra200	3.5/0.75	253.69 ± 97.88
PEO/Ultra200	3.5/1.25	274.57 ± 109.27
PEO/Ultra200	3.5/2.5	235.75 ± 93.18

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

Los resultados del ensayo de tracción dinámica no destructivo en función de la frecuencia para los sistemas en cuestión se muestran en la Tabla 59.

**Tabla 59.** Propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia (1Hz) de los sistemas PEO 3.5/proteína del consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg), en función de la concentración.

Sistema	[PEO/P] %	G' (Pa)	G'' (Pa)	tan δ
PEO	3.5	2.79 x 10 <sup>7</sup>	1.36 x 10 <sup>5</sup>	0.0078
PEO/Ultra200	3.5/0.75	2.67 x 10 <sup>7</sup>	3.79 x 10 <sup>6</sup>	0.150
PEO/Ultra200	3.5/1.25	4.05 x 10 <sup>7</sup>	9.0 x 10 <sup>6</sup>	0.355
PEO/Ultra200	3.5/2.5	2.52 x 10 <sup>7</sup>	2.41 x 10 <sup>5</sup>	0.242

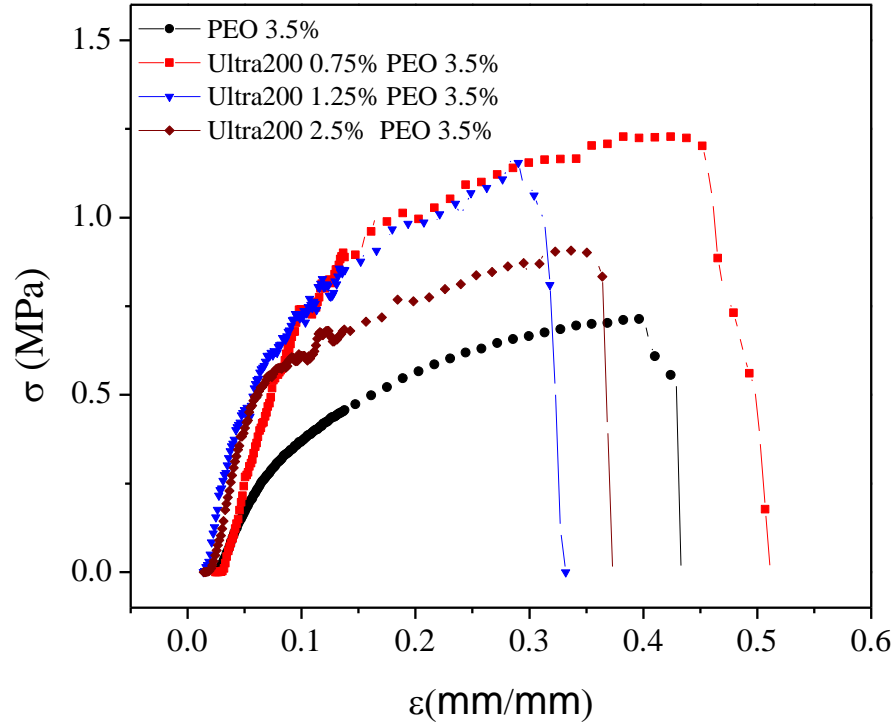
Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

Los resultados muestran un comportamiento típico de una película viscoelástica sólida. El módulo elástico es superior al viscoso entre un y dos órdenes de magnitud. Ambos módulos se mantienen baja dependencia con la frecuencia, en especial el módulo elástico. La adición de proteína del consorcio S pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) mejoró las propiedades viscoelásticas de la membrana en comparación con el blanco. La tangente de pérdida (tan δ) también indica el claro predominio de la respuesta elástica sobre la viscosa.

El ensayo de tracción para obtener la curva de esfuerzo-deformación muestra que la adición de proteína del consorcio S pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa) al 0.75% incrementó considerablemente el esfuerzo máximo y la deformación a la rotura de las nanofibras, Figura 78. Ambos parámetros disminuyeron al aumentar la concentración de proteína al sistema. No obstante, la deformación a la rotura permaneció por arriba de la deformación que mostró el blanco en todos los casos. Existe una pronunciada pendiente inicial que corresponde a la zona elástica lineal. La pendiente corresponde al módulo de Young, que incrementó cuando se añadió proteína del consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa), Tabla 60. Como se comentó anteriormente los resultados sugieren que la proteína y el PEO formaron interacciones importantes que ocasionaron el aumento del esfuerzo máximo de la membrana. Es probable que las

## 5. Resultados y Discusión

interacciones se hicieran más fuertes al incrementar la concentración de proteína en el sistema, lo que deriva en que las nanofibras sean más frágiles que el blanco.



**Figura 78.** Ensayo de tracción hasta la rotura para los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa).

**Tabla 60.** Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo ( $\sigma_{max}$ ) y deformación a la rotura ( $\epsilon_r$ ) para los sistemas: PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa).

Sistema	[PEO/P] %	Módulo de Young (MPa)	$\sigma_{max}$ (MPa)	$\epsilon_r$ (%)
PEO	3.5	$8.33 \pm 0.10$	$0.79 \pm 0.08$	$0.42 \pm 0.02$
PEO/Ultra200	3.5/0.75	$11.11 \pm 0.20$	$1.27 \pm 0.13$	$0.48 \pm 0.04$
PEO/Ultra200	3.5/1.25	$21.45 \pm 0.99$	$1.26 \pm 0.06$	$0.34 \pm 0.01$
PEO/Ultra200	3.5/2.5	$13.56 \pm 1.96$	$0.96 \pm 0.05$	$0.36 \pm 0.01$

Los datos se muestran como media  $\pm$  DS, derivados de mediciones por triplicado.

5.7.2.3 Obtención de membranas por electrohilado, a partir de los sistemas PEO 3.5 %/proteínas de biomasa del consorcio S pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L)

La caracterización física de las soluciones PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L) se muestran en la Tabla 61.

**Tabla 61.** Propiedades físicas de los sistemas PEO 3.5%/proteína de biomasa del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L).

Pretratamiento	[PEO/P] %	Tensión superficial (mN/cm)	Conductividad (μS/cm)	Densidad (gr/cm <sup>3</sup> )	Viscosidad (Pa·s)
PEO	3.5	46.11 ± 0.16	109.1	1.002	0.44 ± 0.03
Ozono9	3.5/0.75	40.73 ± 0.12	3740	1.009	0.58 ± 0.016
Ozono9	3.5/1.25	39.75 ± 0.04	6190	1.013	0.54 ± 0.024
Ozono9	3.5/2.5	40.19 ± 0.12	10240	1.024	0.70 ± 0.021

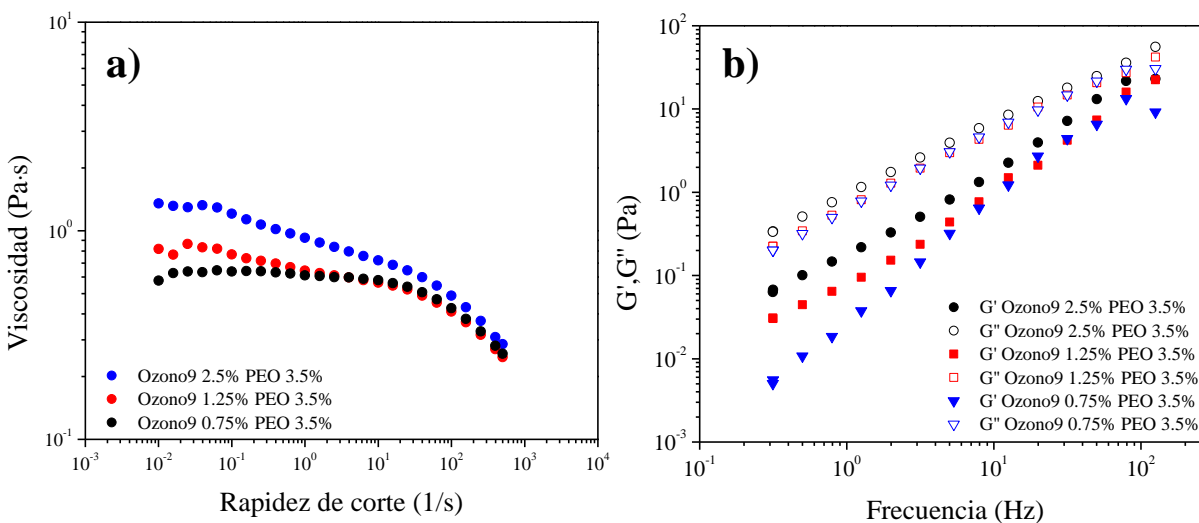
Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

La adición de proteína del consorcio S pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L) a la solución de PEO ocasionó disminución en la tensión superficial. La conductividad aumentó dos órdenes de magnitud para el sistema con mayor concentración de proteína y una orden de magnitud para el resto de los sistemas. La densidad de la solución permanece prácticamente constante y la viscosidad de las soluciones a 10 s<sup>-1</sup> aumentó al añadir proteína de microalgas al sistema y disminuyó al disminuir la concentración de proteína. Como ya se mencionó anteriormente tanto la disminución de la tensión superficial como el aumento en la viscosidad deberían favorecer el proceso de electrohilado.

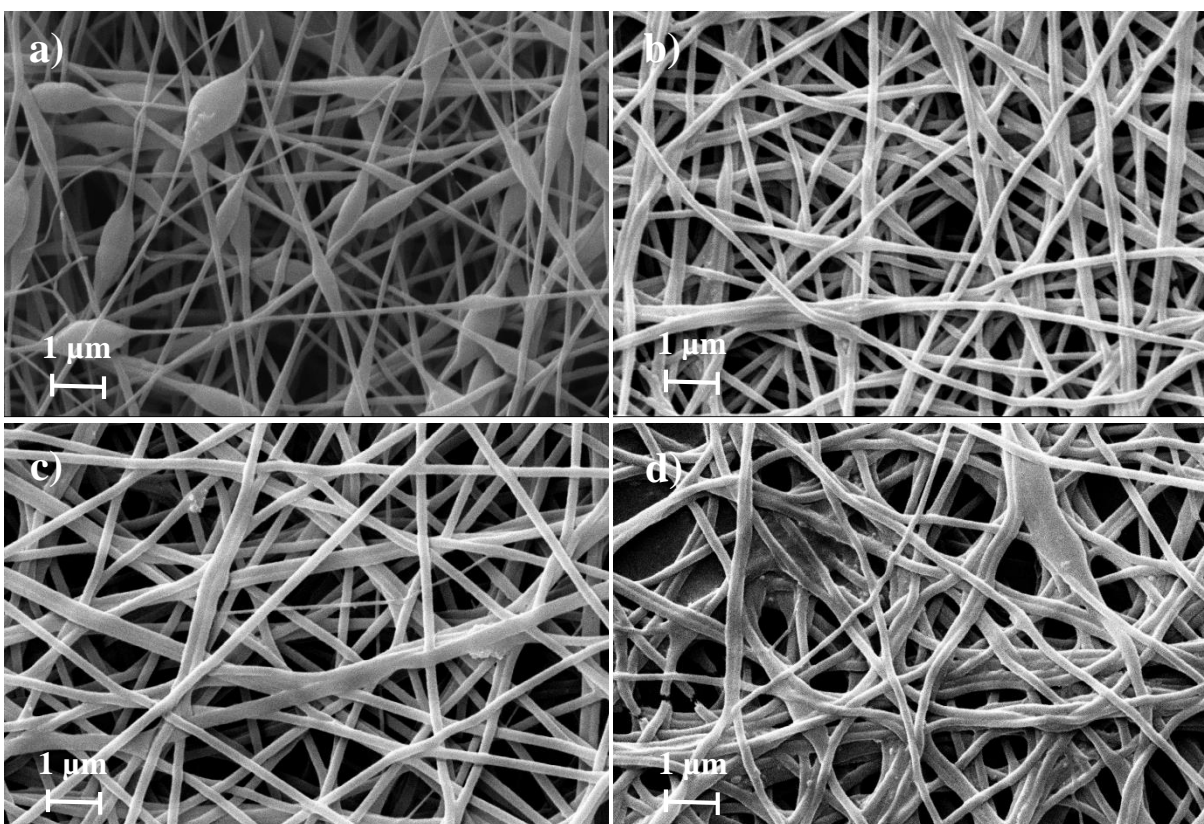
En la Figura 79a se muestran la gráfica de viscosidad frente a la rapidez de corte para el sistema en cuestión. Se puede observar que la viscosidad fue dependiente de la rapidez de corte ya que disminuye a medida que aumentó la rapidez de corte. La viscosidad también mostró dependencia de la concentración de proteína, la viscosidad aumentó a medida que aumentó la concentración de proteína en el sistema.

La Figura 79b muestra que el aumento en la concentración de proteína en los sistemas favorece el incremento de los módulos G' y G". El aumento en la concentración de proteína disminuye la consistencia de la solución y puede llegar a favorecer el proceso de electrohilado. Las disoluciones estudiadas son predominantemente viscosas, ya que el módulo viscoso supera notablemente al módulo elástico en todos los sistemas. Existe una dependencia de los módulos elástico y viscoso con la frecuencia, ya que la pendiente de los módulos es significativa.

## 5. Resultados y Discusión



**Figura 79.** Graficas de: a) viscosidad frente a la rapidez de corte de los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L) a 25 °C y b) propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia de los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L) a 25 °C.



**Figura 80.** Imágenes de microscopia (MEB) a escala de 1 μm (magnificación x10 000) de las membranas de electrohilado de los sistemas a) PEO 3.5% y PEO 3.5%/ proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L) a b) 0.75%, c) 1.25% y d) 2.5% en peso.

## 5. Resultados y Discusión

La microestructura de las membranas se evaluó mediante imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB), Figura 80. Cuando se añade proteína del consorcio S pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L), los defectos que se perciben en el PEO desaparecen. A medida que la concentración de proteína aumentó en la solución las fibras comienzan a mostrar mayor homogeneidad. Sin embargo, la fibra que se obtiene a partir del sistema a una concentración de proteína de 2.5% presenta fibras mucho más gruesas y menos homogéneas.

La Tabla 62 muestra el diámetro promedio de las nanofibras, así como sus desviaciones típicas. La tabla muestra que el aumento de la concentración de proteína en la solución produce un incremento en la homogeneidad de las fibras, con diámetros más uniformes, lo que deriva en una disminución de la desviación estándar. No obstante, la homogeneidad de las fibras disminuye cuando la concentración de proteína en el sistema aumentó hasta 2.5%. Esto puede estar relacionado con la viscosidad de la solución. La viscosidad de la solución incrementó considerablemente a la máxima concentración de proteína en la solución (2.5%).

La viscosidad de la solución es uno de los parámetros determinantes del tamaño y la morfología de las fibras. La viscosidad de una solución de polímero está relacionada con el enredo de las cadenas poliméricas, si las cadenas son menos enredadas, la solución tendrá una viscosidad baja y viceversa. El diámetro de las fibras electrohiladas tiende a aumentar con la viscosidad [317]. Si la solución está muy diluida, las fibras de polímero se rompen en gotas antes de llegar al plato colector debido a la baja tensión superficial; de igual forma, si la solución está muy concentrada, entonces las fibras no se podrán formar, debido a la alta viscosidad, lo que dificulta el paso de la solución a través del capilar [318, 319].

**Tabla 62.** Valores promedio del diámetro de nanofibras de los sistemas PEO 3.5%/proteínas del consorcio S, pretratada con con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L), en función de la concentración.

Sistema	[PEO/P] %	Diámetro promedio (nm)
PEO	3.5	255.14 ± 127.56
PEO/Ozono9	3.5/0.75	260 ± 90.80
PEO/Ozono9	3.5/1.25	329.03 ± 110.27
PEO/Ozono9	3.5/2.5	350.15 ± 141.08

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

Los resultados del ensayo de tracción dinámica no destructivo en función de la frecuencia para los sistemas PEO/proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L), se muestran en la Tabla 63. Los resultados muestran que el módulo elástico es superior al viscoso entre una y dos órdenes de magnitud. No fue posible llevar a cabo el ensayo de tracción de la nanofibra obtenida a la mayor concentración de proteína (2.5%), debido a que el modulo viscoso de las nanofibras aumentó considerablemente con el aumento de la proteína. El material que se obtuvo a la mayor concentración de proteína mostró mayor espesor que el resto de las nanofibras que se obtuvieron con esta proteína. Sin embargo, era un material viscoso y no fue posible despegar la nanofibra del

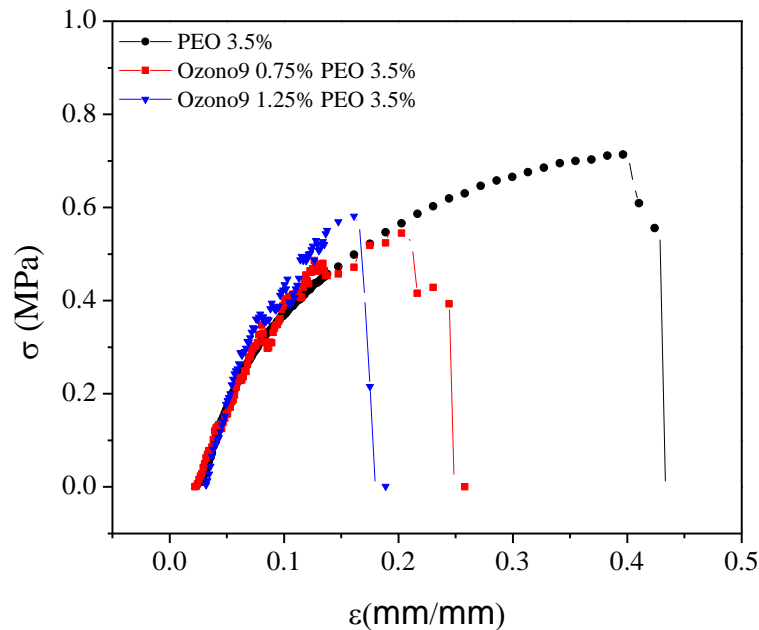
## 5. Resultados y Discusión

material de soporte (aluminio) sin dañarla. La adición de proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L), no mejoró las propiedades viscoelásticas de la membrana en comparación con el blanco, ya que el módulo elástico disminuyó y el modulo viscoso aumentó con el incremento de concentración de proteína en el sistema.

**Tabla 63.** Propiedades viscoelásticas lineales en función de la frecuencia (1Hz) de los sistemas PEO 3.5/proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L), en función de la concentración.

Sistema	[PEO/P] %	G' (Pa)	G'' (Pa)	tan δ
PEO	3.5	2.79 x 10 <sup>7</sup>	1.36 x 10 <sup>5</sup>	0.0078
PEO/Ozono9	3.5/0.75	1.06 x 10 <sup>7</sup>	2.78 x 10 <sup>6</sup>	0.252
PEO/Ozono9	3.5/1.25	1.81 x 10 <sup>7</sup>	4.04 x 10 <sup>6</sup>	0.250

El ensayo de tracción concuerda con los resultados mostrados en la Tabla 54. La adición de proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L), redujo las propiedades elásticas de las nanofibras. Tanto el esfuerzo máximo como la deformación a la rotura disminuyeron, Figura 81.



**Figura 81.** Ensayo de tracción hasta la rotura para los sistemas PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L).

La Tabla 64 muestra que el módulo de Young disminuye con la adición de proteína y, posteriormente, aumentó con el incremento de la concentración de proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L). De igual forma, el esfuerzo máximo disminuyó con la adición de proteína y aumentó con el aumento de la concentración de proteína. No obstante, no llego a superar el esfuerzo máximo mostrado por el PEO. Finalmente, la deformación a la rotura se redujo considerablemente al adicionar e incrementar la cantidad de proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L).



## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 64.** Parámetros de tensión módulo de Young, esfuerzo máximo ( $\sigma_{\max}$ ) y deformación a la rotura ( $\epsilon_r$ ) para los sistemas: PEO 3.5%/proteína del consorcio S, pretratada con ozono (9 mg O<sub>3</sub>/L).

Sistema	[PEO/P] %	Módulo de Young (MPa)	$\sigma_{\max}$ (MPa)	$\epsilon_r$ (%)
PEO 3.5%	3.5	8.33 ± 0.10	0.79 ± 0.08	0.42 ± 0.02
PEO/Ozono9	3.5/0.75	6.35 ± 0.58	0.46 ± 0.01	0.22 ± 0.04
PEO/Ozono9	3.5/1.25	13.48 ± 0.71	0.57 ± 0.01	0.17 ± 0.01

Los datos se muestran como media ± DS, derivados de mediciones por triplicado.

La adición de la proteína del consorcio S en general mostró buenos resultados, ya que fue posible obtener la mayoría de las fibras. El pretratamiento con ultrasonido mostró mejores resultados. Las nanofibras que se obtuvieron con base en proteínas del consorcio S perpetrada con ultrasonido, mostraron mejores propiedades viscoelásticas y mecánicas, en comparación con la nanofibra de PEO que fue el blanco. Las nanofibras con base en proteína del consorcio S, pretratada con ozono, fueron las que mostraron peores propiedades viscoelásticas y mecánicas. Esto se puede explicar en función del efecto del pretratamiento en la proteína. Ambos pretratamientos, ultrasonido y ozono, promovieron la adición de grupos hidroxilo en la fracción de proteína. A su vez esto, promovió la formación de interacciones entre la proteína y el polímero (PEO). No obstante, la formación de estas interacciones no fue siempre positiva, ya que el incremento de estas interacciones promovió la disminución de las propiedades viscoelásticas y mecánicas de las nanofibras obtenidas.

La formación de interacciones entre las cadenas de polímero y la proteína puede favorecer que se formen entrecruzamientos durante el proceso de electrohilado. Esto puede mejorar considerablemente las propiedades mecánicas de las membranas obtenidas. Sin embargo, una alta cantidad de entrecruzamientos disminuye las propiedades elásticas de la nanofibra, lo que puede desfavorecer las propiedades mecánicas. Por otra parte, dependiendo de la fuerza de estas interacciones, las membranas se volverán más o menos frágiles. Es posible que las interacciones que se formen entre las proteínas y PEO sean del tipo puentes de hidrogeno, debido a la adición de grupos hidroxilo a la proteína. El enlace de hidrógeno es una fuerza electrostática dipolo-dipolo fija y se vuelve muy fuerte cuando muchas moléculas están unidas. La formación de estas fuertes interacciones promueve la fragilidad de las nanofibras [316]. Esto se sugiere debido a que en la sección 5.3.3 se encontró que el pretratamiento con ozono incrementó la solubilidad de las proteínas, lo cual se atribuye también a la adición de grupos hidroxilo a la estructura.

La membrana que mostró mejores propiedades mecánicas, así como más homogeneidad en su estructura es la membrana que se obtuvo a partir del sistema PEO 3.5%/proteína del consorcio S pretratada con ultrasonido (200 kWh/kg biomasa). Esto a pesar de que la imagen de SEM se observan defectos en forma de perlas en la membrana de nanofibras obtenida, Figura 77.

### 5.8 Pretratamiento combinado de ultrasonido y ozono, para la recuperación en tándem de lípidos, proteínas, carbohidratos y fósforo

El objetivo principal del pretratamiento combinado de ultrasonido y ozono fue intensificar la recuperación en tándem de los biocomponentes de microalgas, con fines de biorrefinería. Durante el estudio del efecto individual de cada pretratamiento, se demostró que el pretratamiento con ultrasonido es eficaz en la disrupción celular. Lo que mejoró significativamente la recuperación de lípidos y proteínas, redujo el gasto de solventes y evitó el proceso de extracción de proteínas. Por otro lado, el pretratamiento con ozono mostró una baja eficiencia de disrupción celular a los parámetros experimentales aplicados, debido a los bajos rendimientos de lípidos y proteínas recuperados. Sin embargo, fue eficaz en la despolimerización de carbohidratos y su liberación a la fase acuosa.

El pretratamiento con ozono para la recuperación de carbohidratos podría intensificar el proceso de recuperación en tándem de biocomponentes, ya que podría evitar la hidrólisis de carbohidratos. Además, se ha descrito como un pretratamiento eficaz para recuperar el fósforo de una variedad de biomasa como lodos de desecho, lodos de biogás y estiércol. Debido a que los elementos inorgánicos como el fósforo, el nitrógeno y los metales se liberan durante el pretratamiento con ozono [320, 321]. Por lo tanto, la aplicación de pretratamiento con ozono para la recuperación de carbohidratos, además de intensificar el proceso de recuperación, también podría agregar un valor adicional a la biomasa de microalgas. En este contexto, el pretratamiento combinado consistió primero en ultrasonido, para inducir disrupción celular, liberar proteínas a la fase acuosa y extraer lípidos de la biomasa de microalgas. Posteriormente se aplicó el pretratamiento con ozono para liberar carbohidratos y fósforo.

Durante el estudio del efecto individual del ultrasonido en la recuperación en tándem de biocomponentes de microalgas, el rendimiento de los lípidos y proteínas recuperados se estudió como una respuesta individual. Para estudiar el efecto del ultrasonido en la recuperación en tándem de los biocomponentes de microalgas durante el pretratamiento combinado, es necesario estudiar estas respuestas como una sola, para este propósito se aplicó la función de deseabilidad.

#### 5.8.1 Efecto del pretratamiento con ultrasonido en la disrupción celular, liberación de proteínas y extracción de lípidos

En el caso del pretratamiento de ultrasonido de biomasa del consorcio D se encontró que el rendimiento máximo de proteínas liberadas a la fase acuosa ( $92 \pm 8\%$ ) y el rendimiento máximo de lípidos extraídos ( $68 \pm 1\%$ ) se alcanzaron a una concentración de biomasa de 75 g/L y energía aplicada de 50 kWh/kg de biomasa seca, la deseabilidad de este experimento fue de 0.88. En el caso de la biomasa del consorcio S se encontró que el rendimiento máximo de proteínas liberadas a la fase acuosa ( $91 \pm 8\%$ ) y el rendimiento máximo de lípidos extraídos ( $89 \pm 1\%$ ) se alcanzaron a una concentración de biomasa de 25 g/L y energía aplicada de 200 kWh/kg de biomasa seca, la deseabilidad de este experimento fue de 0.9.

Debido a la alta liberación de proteínas a la fase acuosa durante el pretratamiento con ultrasonido, se concluye que hubo una alta disrupción celular a estos parámetros experimentales, lo cual puede mejorar significativamente la liberación de carbohidratos y fósforo durante el pretratamiento con ozono. Por lo tanto, para llevar a cabo el pretratamiento combinado, estos fueron los parámetros experimentales utilizados durante el pretratamiento con ultrasonido.

5.8.2. Efecto del pretratamiento con ozono en la liberación de carbohidratos

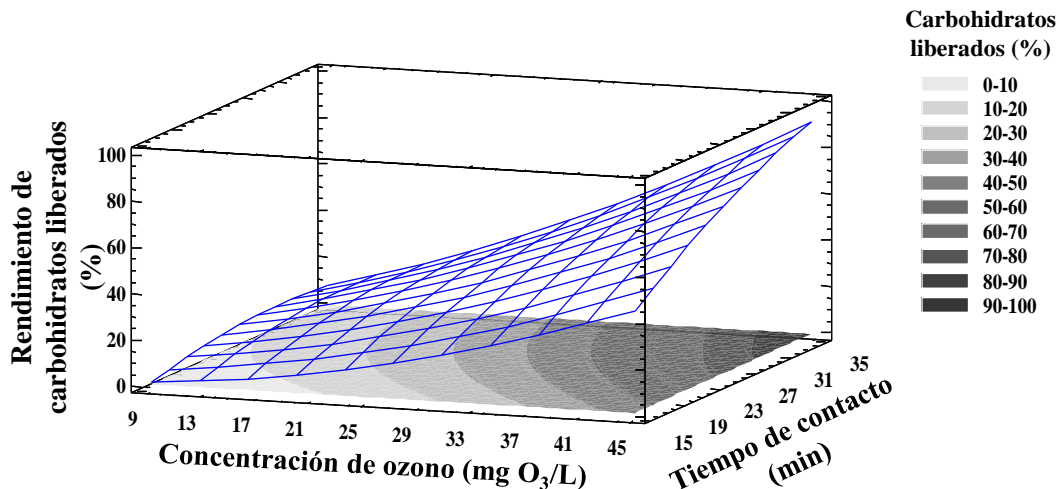
La recuperación de carbohidratos y fósforo de biomasa residual de microalgas mediante pretratamiento con ozono, se llevó a cabo después del pretratamiento de la biomasa con ultrasonido, la liberación de proteínas a la fase acuosa y la extracción de lípidos. En el caso de biomasa del consorcio D, todos los parámetros experimentales mostraron un efecto significativo sobre el rendimiento de los carbohidratos liberados, Tabla 65. La concentración de ozono, el tiempo de contacto y el pH tuvieron un efecto positivo, el rendimiento de los carbohidratos liberados a la fase acuosa aumentó a medida que aumentó la concentración de ozono, el tiempo de contacto y el pH.

**Tabla 65.** Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta, para el rendimiento de carbohidratos liberados después del pretratamiento de biomasa del consorcio D con ultrasonido y ozono(n=3).

Fuente	Carbohidratos
	P Valor
Concentración de ozono (mg O <sub>3</sub> /L)	<b>0.000</b>
Tiempo de contacto (min)	<b>0.000</b>
pH	<b>0.003</b>

Des Std.: 7.61; Error abs.: 4.58  
 Texto en negritas denota p < 0.05.

El rendimiento máximo de carbohidratos liberados (84%) se logró a la concentración de ozono más alta de 45 mg O<sub>3</sub>/L, tiempo de contacto de 35 min y pH de 11, que representa el consumo de ozono de 420 mg O<sub>3</sub>/g de biomasa, Figura 82.



**Figura 82.** Superficie de respuesta del rendimiento de carbohidratos de biomasa del consorcio D, liberados en función del tiempo de contacto y la concentración de ozono. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos.

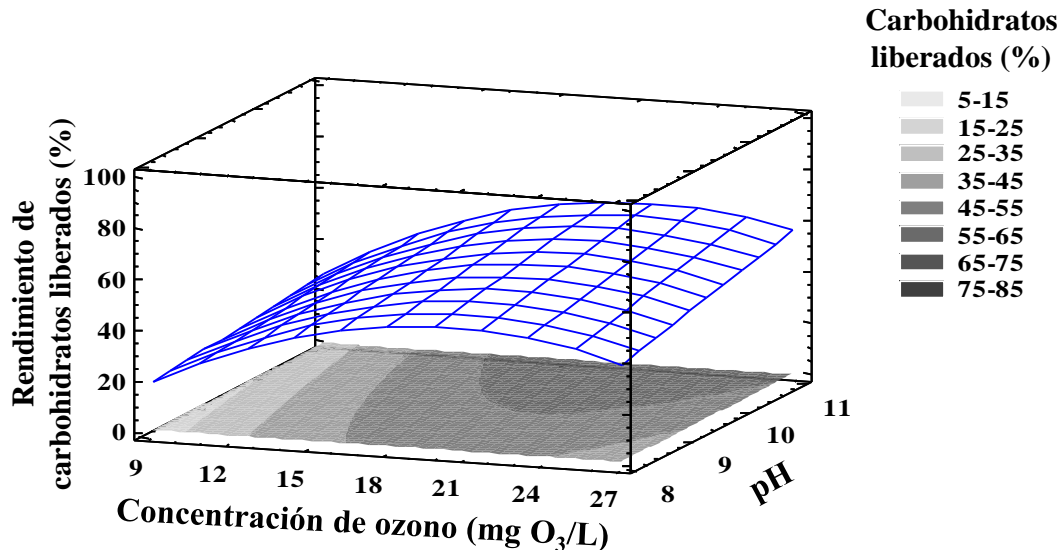
## 5. Resultados y Discusión

En el caso de biomasa del consorcio S, la concentración de ozono y el pH fueron los parámetros experimentales que mostraron un efecto significativo en el rendimiento de los carbohidratos liberados, Tabla 66.

**Tabla 66.** Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta, para el rendimiento de carbohidratos liberados después del pretratamiento de biomasa del consorcio S con ultrasonido y ozono (n=3).

Fuente	Carbohidratos
	P Valor
Concentración de ozono (mg O <sub>3</sub> /L)	<b>0.005</b>
Tiempo de contacto (min)	0.1347
pH	<b>0.026</b>

El mayor rendimiento de carbohidratos liberados ( $85 \pm 2\%$ ) se logró a la concentración de ozono de 21 mg O<sub>3</sub>/L, tiempo de contacto de 25 min y pH de 11, Figura 83.



**Figura 83.** Superficie de respuesta del rendimiento de carbohidratos de biomasa del consorcio S, liberados en función del pH y la concentración de ozono. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos.

Para ambos tipos de biomasa, la concentración de ozono tuvo un efecto positivo en el rendimiento de los carbohidratos liberados. El rendimiento de carbohidratos liberados aumentó cuando la concentración de ozono incrementó. Esto puede explicarse en términos de la estructura y disposición de los carbohidratos en la pared celular de las microalgas. Las dos capas de la pared celular de las microalgas contienen una matriz de polisacáridos. La capa externa contiene carbohidratos como pectina, agar, alginato y algaenan. La capa interna contiene hemicelulosa, pectina y glicoproteína [322]. Estos componentes están unidos entre sí y forman una red compleja, conocida como matriz de celulosa, que proporciona recalcitrancia a las microalgas. La gran cantidad de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo en las moléculas de celulosa producen una estructura cristalina que se llama microfibrilla. Las microfibrillas hacen que las moléculas de

---

## 5. Resultados y Discusión

---

celulosa sean más resistentes y rígidas, lo que aumenta el consumo de ozono para la liberación de carbohidratos y, además, evita su biodegradabilidad [323].

En adición a la recalcitrancia natural de las microalgas, el pretratamiento con ultrasonido produjo la liberación de carbohidratos a la fase acuosa, lo que pudo aumentar la recalcitrancia de la biomasa remanente. Las microburbujas creadas durante el pretratamiento con ultrasonido producen la termólisis del agua, formando radicales libres altamente reactivos como  $H\bullet$  y  $OH\bullet$ . Los radicales  $H\bullet$  y  $OH\bullet$  en solución acuosa reaccionan con la celulosa al extraer un átomo de H de su carbono, lo que da como resultado la escisión aleatoria de enlaces glucosídicos y favorece la adición de grupos  $OH\bullet$  a la estructura [324]. La adición de grupos hidroxilo a las moléculas de celulosa favorece la formación de microfibrillas, lo que aumentó la recalcitrancia de la biomasa y, a su vez aumentó, el consumo de ozono para la liberación de carbohidratos [323].

El pH también tuvo un efecto positivo en la liberación de carbohidratos para ambos tipos de biomasa, el rendimiento de los carbohidratos liberados aumentó a medida que incrementó el pH. El pretratamiento con ozono fue más efectivo a pH alcalino, porque una condición básica aumenta la formación de radicales hidroxilo, esto mejora la cinética y la eficiencia de la reacción. El ozono en pH ácido puede reaccionar directamente con un sustrato orgánico, a través de una reacción lenta y selectiva. No obstante, un pH alcalino favorece una reacción rápida y no selectiva a través de radicales hidroxilo. Por lo tanto, los radicales hidroxilo formados en la fase líquida son decisivos en la descomposición y solubilización de compuestos difíciles de degradar como la celulosa [324]. Herrera-Adarme y colaboradores [322] encontraron resultados similares. Ellos informaron la solubilización máxima de 45% de lignina, 48% de hemicelulosas y 41% de celulosa durante la ozonización de la caña de azúcar a pH 11. Descubrieron que el mecanismo de liberación de hemicelulosas era dependiente del pH. Cuando se usó una condición ácida, hubo una menor formación de radicales hidroxilo y la reacción se produjo principalmente por ataque directo de ozono. El ataque directo del ozono requirió una mayor tasa de flujo de ozono para asegurar un medio con una mayor cantidad de radicales hidroxilo.

Finalmente, el tiempo de contacto tuvo un efecto significativo en la recuperación de carbohidratos de biomasa del consorcio D. El rendimiento de los carbohidratos liberados aumentó cuando aumento el tiempo de contacto. El incremento del tiempo de contacto, además de incrementar la dosis de ozono, también favorece la reacción entre el ozono o los radicales hidroxilo y los carbohidratos. Sin embargo, con propósito de evitar la formación de compuestos inhibidores para la fermentación de carbohidratos durante el retratamiento con ozono se deben evitar tiempos de contacto más largos que 60 minutos. El efecto del tiempo de contacto sobre la biomasa del consorcio D se puede explicar en términos de la estructura de la pared celular de esta especie de microalgas. Como se mencionó anteriormente, las células de *Desmodesmus sp.* tienen una capa más en su pared celular que las células de *Scenedesmus obliquus*. Este efecto también es perceptible en la concentración de ozono a la cual se obtuvo la máxima liberación de carbohidratos. La máxima eficiencia de liberación de carbohidratos de biomasa del consorcio D se obtuvo a la concentración de biomasa más alta (45 mg  $O_3/L$ ), mientras que la cantidad máxima de liberación de carbohidratos de biomasa del consorcio S se obtuvo a la concentración de ozono de 21 mg  $O_3/L$ . Cuando la concentración de ozono aumentó durante la recuperación de carbohidratos de biomasa del consorcio S, el rendimiento de liberación de carbohidratos disminuyó. Esto se atribuye principalmente a la degradación de los carbohidratos.

## 5. Resultados y Discusión

El pretratamiento con ozono para la delignificación de una variedad de biomásas, como paja de trigo, lubina de la caña de azúcar y rastrojo de maíz, entre otros, tiene un consumo de ozono entre 12 y 33 g de  $O_3/100$  g de biomasa. El consumo de ozono para estas biomásas es entre dos y tres órdenes de magnitud mayor que para el pretratamiento de biomasa de microalgas del consorcio D (0.126 g  $O_3/100$  g biomasa) y del consorcio S (0.042 g  $O_3/100$  g biomasa). Por lo tanto, las especies de microalgas enriquecidas en carbohidratos son materias primas más atractivas para la producción de biocombustibles fermentativos que la biomasa lignocelulósica [32].

### 5.8.3 Efecto del pretratamiento con ozono en la liberación de fósforo total y ortofosfatos

La recuperación de fósforo de la biomasa de microalgas se estudió en términos de la liberación de fósforo total (TP) y ortofosfatos (orto- $PO_4^{3-}$ ). Esto con el propósito de conocer las formas del fósforo disponibles en la solución para su recuperación. En el caso de la biomasa del consorcio D el tiempo de contacto y el pH tuvieron un efecto significativo en el rendimiento de TP liberado. Ambos parámetros experimentales mostraron un efecto positivo: el rendimiento de TP liberado aumentó a medida que aumentó el tiempo de contacto y la concentración de ozono, Tabla 67.

**Tabla 67.** Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático de superficie de respuesta para el rendimiento de TP y orto- $PO_4^{3-}$  liberados después del pretratamiento de biomasa del consorcio D con ultrasonido y ozono (n=3).

Fuente	TP <sup>a</sup>	Orto- $PO_4^{3-}$ <sup>b</sup>
	P Valor	P Valor
Concentración de ozono (mg $O_3/L$ )	0.2305	0.6709
Tiempo de contacto (min)	<b>0.001</b>	0.304
pH	<b>0.000</b>	<b>0.029</b>

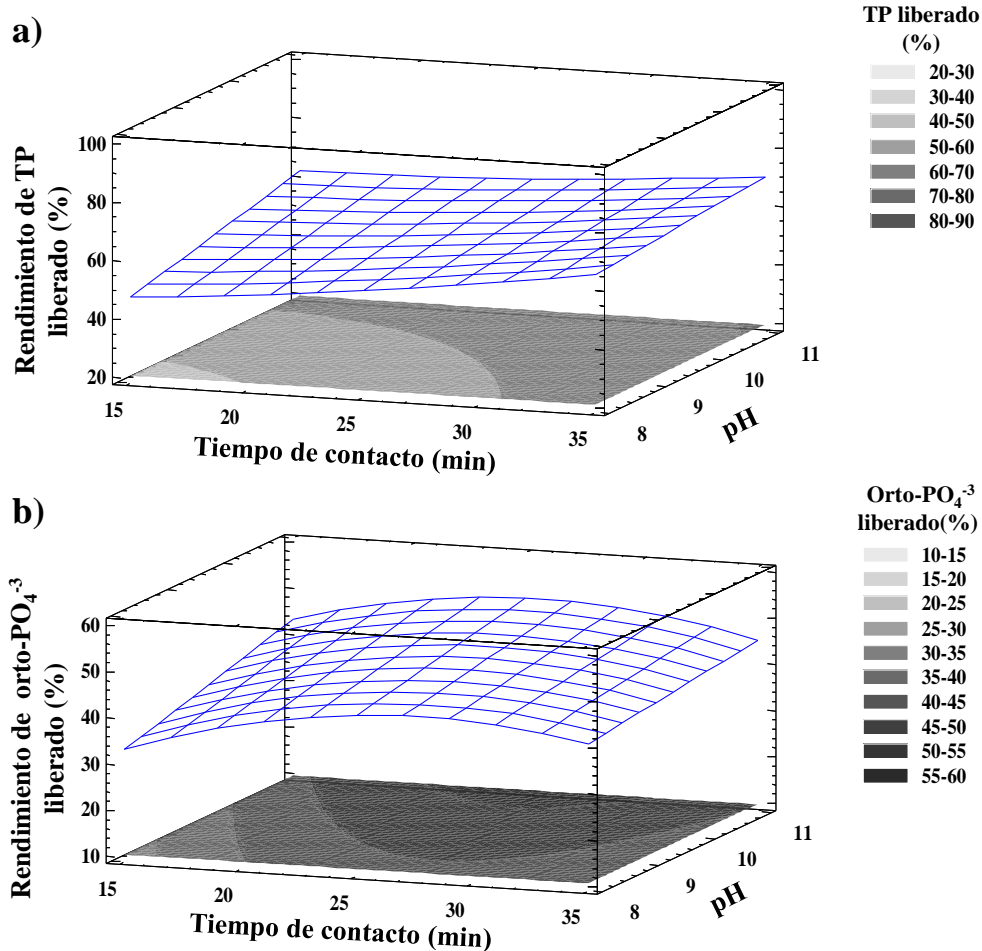
<sup>a</sup> Des Std.: 7.78; Error abs.: 4.71;

<sup>b</sup> Des Std.: 9.64; Error abs.: 5.75;

Texto en negritas denota  $p < 0.05$ .

El rendimiento máximo de TP liberado (88%) se logró a los parámetros experimentales de concentración de ozono de 27 mg  $O_3/L$ , tiempo de contacto de 35 min y pH de 11, Figura 84a. Para la recuperación de orto- $PO_4^{3-}$ , solo el pH mostró un efecto significativo sobre el rendimiento de orto- $PO_4^{3-}$  liberado, el rendimiento de orto- $PO_4^{3-}$  liberado aumentó a medida que el pH aumentó. El rendimiento máximo de orto- $PO_4^{3-}$  liberado (53%) se logró con los parámetros experimentales de concentración de ozono de 9 mg  $O_3/L$ , tiempo de contacto de 35 min y pH de 11, Figura 84b.

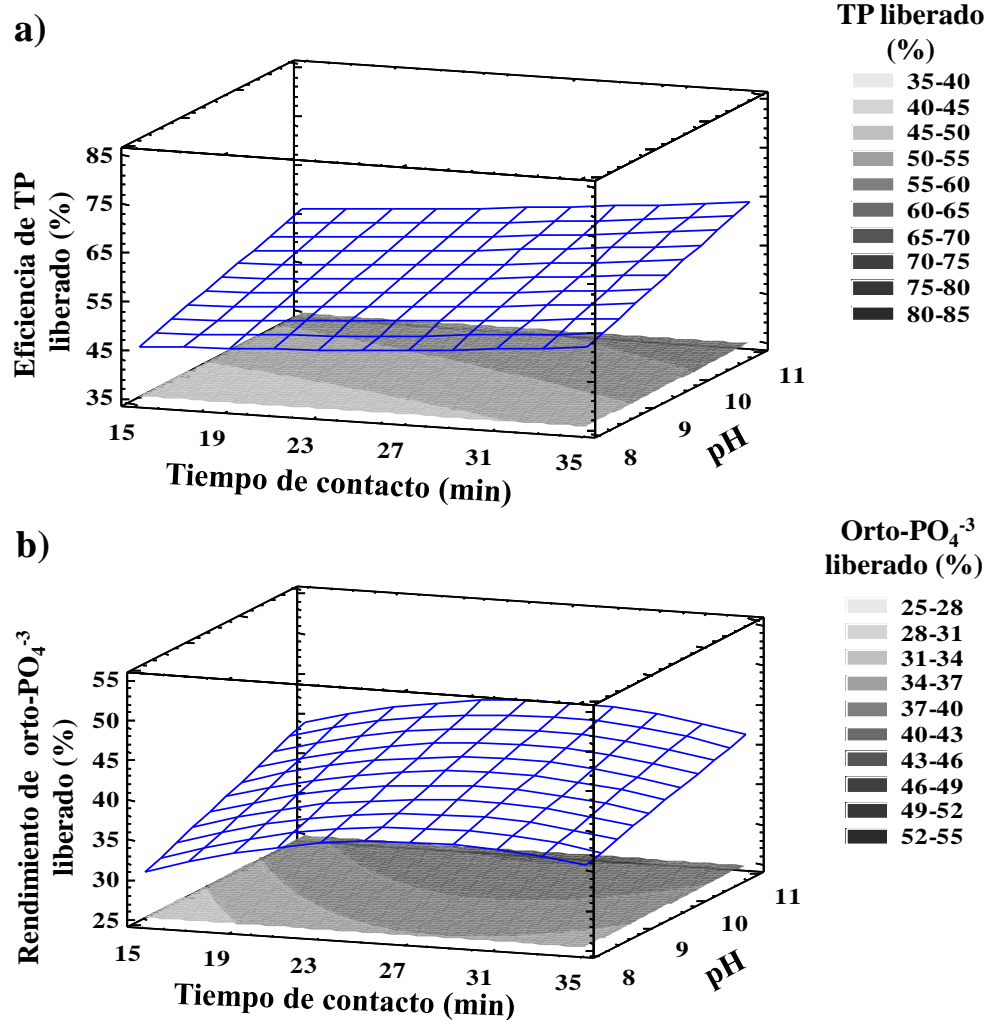
## 5. Resultados y Discusión



**Figura 84.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) fósforo total y b) ortofosfatos de biomasa del consorcio D, liberados en función del pH y del tiempo de contacto. Se muestran mediciones por triplicado ( $n=3$ ) para cada conjunto de datos.

En el caso de biomasa del consorcio S, el pH mostró un efecto significativo sobre el rendimiento de TP y orto- $\text{PO}_4^{3-}$  liberados, con valores de  $p$  de 0.020 y 0.031, respectivamente. El rendimiento de TP y orto- $\text{PO}_4^{3-}$  aumentó a medida que aumentó el pH. El mayor rendimiento de ambos TP ( $85 \pm 3\%$ ) y orto- $\text{PO}_4^{3-}$  ( $51 \pm 0.3\%$ ) liberados se obtuvo a la concentración de ozono de 9 mg  $\text{O}_3/\text{L}$ , tiempo de contacto de 25 min y pH de 11, Figuras 85a y 85b.

## 5. Resultados y Discusión



**Figura 85.** Superficie de respuesta del rendimiento de a) fósforo total y b) ortofosfatos de biomasa del consorcio S, liberados en función del pH y el tiempo de contacto. Se muestran mediciones por triplicado ( $n=3$ ) para cada conjunto de datos.

Como ya se mencionó anteriormente el pH alcalino favorece el pretratamiento con ozono ya que incrementó la cantidad de iones hidroxilo, lo que promueve la liberación tanto de carbohidratos como de TP y  $\text{orto-PO}_4^{3-}$ .

Por otra parte, para ambos tipos de biomasa, el máximo rendimiento de TP liberado es mayor en alrededor 30% que el máximo rendimiento de  $\text{orto-PO}_4^{3-}$  liberado. Esto sugiere que aproximadamente 30% del fósforo liberado se encuentra como otras formas solubles del fósforo. El fósforo es un elemento esencial requerido en forma de  $\text{orto-PO}_4^{3-}$  para constituyentes celulares de microalgas como fosfolípidos, nucleótidos y ácidos nucleicos [325]. No obstante, bajo ciertas condiciones, las microalgas pueden activarse para absorber mucho más fósforo del necesario para sobrevivir. Esta absorción de fósforo adicional se almacena como polifosfato, que luego puede ser utilizada por la célula como un recurso interno cuando la concentración de fósforo externa es limitante para el crecimiento. Por lo tanto, es probable que el 30% del fósforo liberado de la biomasa de microalgas existiera en forma de polifosfato. Los polifosfatos son moléculas de cadena



larga de longitud variable, generalmente se dividen en dos tipos, estos son polifosfato soluble en ácido y polifosfato insoluble en ácido. Se cree que los polifosfatos solubles en ácido son moléculas de cadena más corta y están involucradas en el metabolismo [325]. Los polifosfatos insolubles en ácido son polifosfatos de cadena más larga que se utilizan para el almacenamiento de fósforo a largo plazo. Los polifosfatos son relativamente estables en soluciones acuosas neutras, sin embargo, se degradan a fosfatos condensados inferiores en soluciones fuertemente ácidas o básicas [326].

En las microalgas se han identificado dos mecanismos de almacenamiento de polifosfato diferentes. Cuando las microalgas carecen de fósforo y luego se vuelven a exponer al fósforo, el almacenamiento consecuente se conoce como sobrecompensación o fenómeno de sobreimpulso. Este fenómeno requiere entornos donde las microalgas tienen períodos de inanición de fósforo y, por lo tanto, solo se producen en sistemas con concentraciones de fósforo muy bajas, como lagos. El otro mecanismo de almacenamiento de polifosfato se conoce como "captación de lujo". La absorción de P de lujo en las microalgas ocurre cuando las microalgas absorben más fósforo de lo requerido para el crecimiento sin una etapa previa de inanición [326]. Esto significa que cualquier acumulación de fósforo en microalgas que se lleve a cabo en aguas residuales se debe al mecanismo de captación de lujo. Solovchenko y colaboradores [327] informaron un estudio centrado en la absorción de orto- $\text{PO}_4^{3-}$  y la formación de polifosfato en cultivos de *Chlorella vulgaris*. Durante el estudio se distinguieron dos fases de absorción de orto- $\text{PO}_4^{3-}$ , la primera fase se denominó fase rápida de absorción de orto- $\text{PO}_4^{3-}$ , y la segunda fase se caracterizó como una fase de absorción más lenta de orto- $\text{PO}_4^{3-}$ . Durante la primera fase, las microalgas tomaron orto- $\text{PO}_4^{3-}$  a una tasa más alta (6–9 g P/g de células) que en la segunda fase. La absorción de orto- $\text{PO}_4^{3-}$  en el patrón de la primera fase es parecida al que muestran las células de microalgas sometidas a la limitación de P transferidas a un entorno repleto de fósforo. La rápida absorción de orto- $\text{PO}_4^{3-}$  en esta fase resultó en un aumento temporal en el contenido de TP en la biomasa hasta en un 5% del peso seco de la célula. Al final de la primera fase de la absorción de orto- $\text{PO}_4^{3-}$ , las microalgas estudiadas reanudaron un crecimiento exponencial. La tasa de absorción de orto- $\text{PO}_4^{3-}$  en la fase de crecimiento disminuyó aproximadamente en un orden de magnitud y el nivel de polifosfato en la célula se redujo rápidamente. La mayor parte de la orto- $\text{PO}_4^{3-}$  absorbida por la célula durante la primera fase se convierte en fosfatos de azúcar, ácidos nucleicos y fosfolípidos. El contenido de polifosfato en las microalgas comenzó a aumentar nuevamente cuando la división celular disminuyó. La biosíntesis de polifosfato durante la división celular lenta ayuda a retener el exceso de orto- $\text{PO}_4^{3-}$ , que es absorbido por la célula, pero no puede ser consumido de inmediato. Teniendo en cuenta la dinámica registrada del contenido de polifosfato celular, la división celular y la absorción de orto- $\text{PO}_4^{3-}$ , se puede generalizar que la formación de polifosfato en las células microalgales es promovida por un alto flujo de orto- $\text{PO}_4^{3-}$  y disminuye cuando las células se dividen rápidamente [327].

Resultados similares se encontraron en este estudio ya que dos fases para la absorción de P se pudieron distinguir durante el proceso de cultivo para ambas especies de biomasa, Figuras 14 y 16. En la primera fase de la absorción de orto- $\text{PO}_4^{3-}$  (día 1 a 16 del proceso de cultivo) se observó un crecimiento exponencial de microalgas, 37% del orto- $\text{PO}_4^{3-}$  en las aguas residuales se removió. Después del día 16 de cultivo, el crecimiento de la biomasa se ralentiza, el TSS solo aumentó de 660 a 680 mg/L en el caso de biomasa del consorcio D y de 760 a 890 mg/L en el caso de biomasa del consorcio S. Sin embargo, 17% del orto- $\text{PO}_4^{3-}$  en el agua residual fueron removidos del día 16

al 27 de cultivo en el caso de biomasa del consorcio D y 14% en el caso de biomasa del consorcio S. Por lo tanto, se puede concluir que la absorción de orto- $\text{PO}_4^{-3}$  de los últimos 14 días de cultivo podría inducir la biosíntesis de polifosfato.

Finalmente, el tiempo de contacto tuvo un efecto importante en el rendimiento de liberación de TP de biomasa del consorcio D. El rendimiento del TP liberado aumentó a medida que aumentó el tiempo de contacto. Este efecto puede explicarse a partir de la pared celular de esta especie de microalgas y de la disposición y estructura del polifosfato en la célula de microalgas. En las células de microalgas, el polifosfato se encuentra como gránulos metacromáticos. Los gránulos de polifosfato que contienen polifosfato insoluble en ácido con cadenas largas están presentes en el citoplasma. Mientras que el polifosfato soluble en ácido con cadenas cortas se puede encontrar en la superficie celular, el periplasma y la membrana plasmática [326]. Debido a que el polifosfato es principalmente material intracelular es necesario llevar a cabo la disrupción celular para inducir su liberación. No obstante, debido a que las células de *Desmodesmus sp.* tienen cuatro capas en su pared celular la liberación de polifosfato a la fase acuosa tiene una alta demanda de ozono.

A pesar de que el pretratamiento con ultrasonido induce la liberación de polifosfato debido a la alta disrupción celular producida, de forma similar que la liberación de carbohidratos, los polifosfatos deben hidrolizarse para promover su liberación, lo que aumentó la demanda de ozono. Los polifosfatos son polímeros (lineales, de anillo o ramificados) de al menos tres iones de fosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido (P – O – P). Dada la estructura de las moléculas de polifosfato, la hidrólisis ocurre a través de la ruptura aleatoria de los enlaces de fosfoanhídrido en los grupos terminales o intermedios a través de radicales ozono o hidroxilo. Esta vía conducirá a más polifosfatos (en términos de concentración molecular) con longitudes de cadena más cortas con el tiempo. Debido a que el rendimiento del TP liberado aumentó cuando aumentó el tiempo de contacto, se puede concluir que el polifosfato hidrolizado, a través de los radicales ozono o hidroxilo, produjo polifosfatos de cadena más corta que se liberaron a la fase acuosa.

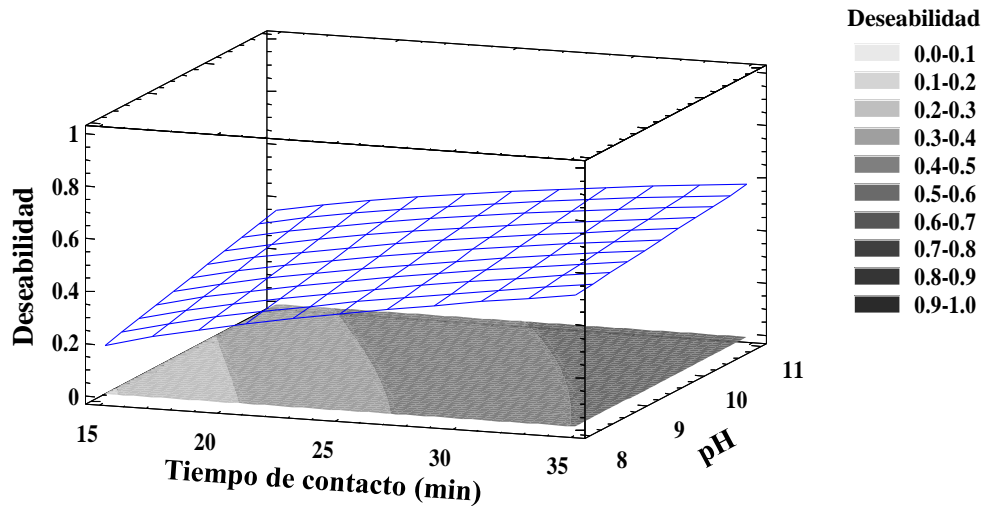
Cosgun y Semerci encontraron resultados similares, estudiaron el pretratamiento de los lodos de desecho para los nutrientes liberados por un pretratamiento combinado ozono/microondas [321]. Sus resultados mostraron hasta el 96% del fósforo total en el lodo de aguas residuales solubilizado en la solución, ya que el tratamiento previo con microondas libera los polifosfatos debido a la lisis celular lograda. También observaron que la ozonización de los lodos residuales pretratados alcalinos mejoraba la solubilización total de fósforo. En contraste, la ozonación del lodo crudo y el lodo pretratado con ácido resultó en una precipitación de fósforo incontrolable durante el proceso de ozonación [320]. La liberación de ambas formas de fósforo, orto- $\text{PO}_4^{-3}$  y polifosfato, es deseable, ya que ambas formas de fósforo pueden ser valorizadas como fertilizantes. Los polifosfatos son productos químicos industriales importantes, que se usan con frecuencia en el procesamiento de minerales, el tratamiento del agua, la industria alimentaria y los fertilizantes agrícolas [326]. Considerando el estado de reserva de fósforo y su valor, la recuperación de polifosfato de las microalgas es significativa.

### 5.8.4 Valorización simultánea de carbohidratos y fósforo de biomasa de microalgas

Nuevamente la función de deseabilidad se aplicó con el fin de encontrar los parámetros experimentales para el pretratamiento con ozono que proporcionan una buena respuesta para la valorización simultánea de carbohidratos y fósforo. Para la valorización simultánea de

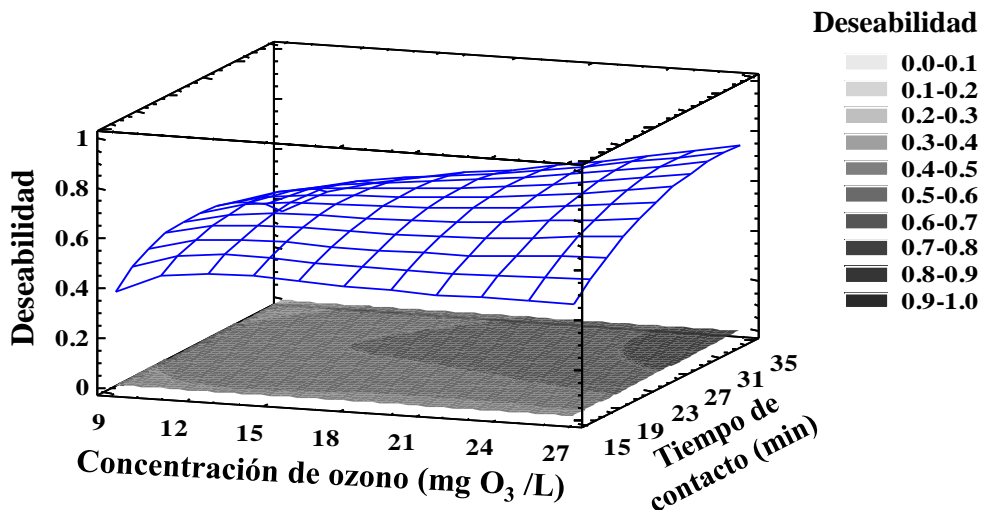
## 5. Resultados y Discusión

carbohidratos y P de biomasa del consorcio D, los rendimientos máximos de carbohidratos (84%) y fósforo (58%) liberados se lograron a la concentración de ozono de 45 mg O<sub>3</sub>/L, tiempo de contacto de 35 min y pH de 11, la deseabilidad de este experimento fue de 0.75, Figura 86.



**Figura 86.** Superficie de respuesta de la función de deseabilidad para la recuperación de carbohidratos y fósforo de biomasa del consorcio D, en función del pH y el tiempo de contacto. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos.

En el caso de biomasa del consorcio S, los parámetros experimentales aplicados que proporcionan una buena respuesta tanto para la liberación de carbohidratos y fósforo fueron concentración de biomasa de 25 g/L, concentración de ozono de 27 mg O<sub>3</sub>/L, tiempo de contacto de 25 min y pH de 11. Los rendimientos máximos de carbohidratos y TP alcanzados a estas condiciones experimentales fueron  $63 \pm 1\%$  y  $75 \pm 0.3\%$ , respectivamente,  $47 \pm 3\%$  del TP liberado se liberaron como orto-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, Figura 87.



**Figura 87.** Superficie de respuesta de la función de deseabilidad para la recuperación de carbohidratos y fósforo de biomasa del consorcio S, en función del tiempo de contacto y la concentración de ozono. Se muestran mediciones por triplicado (n=3) para cada conjunto de datos.

### 5.8.5 Intensificación de la recuperación en tándem de biocomponentes de biomasa de microalgas y fósforo

Como se estudió en la sección 5.2.8 de la tesis, el pretratamiento con ultrasonido intensifica la recuperación de proteínas, ya que evita el proceso de extracción con NaOH debido a la liberación de proteínas a la fase acuosa, inducida a su vez por la alta disrupción celular alcanzada. Así mismo la alta disrupción celular induce la disminución del gasto de solventes en 95% y el tiempo de extracción durante la extracción de lípidos. De forma similar, el pretratamiento con ozono intensifica el proceso de recuperación de carbohidratos y fósforo, ya que evita el uso de reactivos químicos como  $H_2SO_4$  y NaOH. Estos reactivos son normalmente utilizados durante la hidrólisis de carbohidratos y fósforo, respectivamente. Otras ventajas del pretratamiento con ozono incluyen que el proceso se realiza a temperatura y presión ambiente, a diferencia de las altas temperaturas y presión necesarias para los métodos de pretratamiento utilizados habitualmente para la recuperación de carbohidratos y fósforo.

En las últimas dos décadas se han investigado muchos métodos de pretratamiento para la recuperación de carbohidratos de la biomasa de microalgas. Sin embargo, un método de pretratamiento sostenible para la recuperación de carbohidratos debe cumplir con algunos criterios, como (1) la despolimerización de la celulosa para la producción eficiente de biocombustibles, (2) pérdida mínima de hemicelulosas y celulosa, (3) generación de ninguno o pocos inhibidores, (4) ninguna o baja formación de residuos y (5) consumo de poca o ninguna sustancia química [323]. En este sentido, el proceso de pretratamiento combinado sugerido ha cumplido con la mayoría de estos criterios sostenibles. El pretratamiento con ozono, posterior al pretratamiento con ultrasonido, logró altos rendimientos de carbohidratos liberados, no se observó pérdida de carbohidratos y no se produjeron residuos. Los productos químicos como NaOH solo fueron utilizados para aumentar el pH de la suspensión de microalgas y aumentar la concentración de radicales hidroxilo durante el pretratamiento. Además, se ha informado que el tratamiento con ozono no genera los inhibidores comunes generados durante la hidrólisis de biomasa de microalgas, como el furfural y el 5-hidroximetilfurfural. Estos inhibidores potencialmente reprimen la producción de biocombustibles fermentativos y su eliminación también tiene un alto costo [32, 323, 324].

Una tecnología ideal para la recuperación de fósforo debe alcanzar tasas máximas de recuperación, buena remoción y destrucción de sustancias potencialmente peligrosas (metales pesados, micropolutantes orgánicos y patógenos) y cualquier material aplicable con bajo riesgo ambiental, buenos efectos de fertilización y eficiencia económica. El pretratamiento secuencial sugerido en este trabajo cumple con la mayoría de estos criterios ya que la recuperación de fósforo se logró mediante el pretratamiento con ozono. El pretratamiento con ozono garantiza la destrucción de sustancias potencialmente peligrosas, ya que el ozono tiene la capacidad de degradar microcontaminantes, reducir las bacterias patógenas facultativas y los genes de resistencia a los antibióticos presentes en el agua residual. Además, el proceso de pretratamiento logró altos rendimientos de TP liberado (88%), y la recuperación de fósforo liberado a la fase acuosa carece de la mayoría de los inconvenientes asociados con la precipitación de fósforo del agua residual municipal. La solución de fósforo obtenida después del pretratamiento con ozono contiene entre 177.5 y 274.5 mg de P/L, que representa entre 8 y 14 veces más que las aguas residuales municipales. La concentración de iones como el hierro y el aluminio es baja en comparación con

las aguas residuales, ya que no se observaron precipitaciones no controladas y se utilizó agua destilada a través del proceso de pretratamiento secuencial. Esto evita la precipitación de fósforo en forma de productos no deseados, como fosfatos de hierro o aluminio, que no se pueden usar como fertilizantes y deben procesarse para su eliminación.

Los resultados obtenidos demuestran que la recuperación de fósforo usando el pretratamiento secuencial sugerido en este estudio se puede lograr con bajos costos, incluso si el fósforo se recupera del sobrenadante. Debido a que actualmente es posible recuperar un alto porcentaje (70-90%) de fósforo vía precipitación química en condiciones específicas con pocos costos adicionales. La recuperación de fósforo puede agregar a la biomasa de microalgas un valor de hasta 39.8 euros/kg P recuperado [328].

### 5.8.6 Comparación con otros estudios

La recuperación de carbohidratos de biomasa de microalgas es importante porque la conversión de azúcares asimilables de la biomasa de microalgas se puede lograr de manera más eficiente y económica que a partir de biomasa lignocelulósica. Debido a que la lignina está ausente en la celulosa con base en biomasa de microalgas y el contenido de hemicelulosa también es muy bajo [32]. En comparación con estudios previos centrados en la recuperación de carbohidratos, el proceso de pretratamiento combinado mostró rendimiento similar de carbohidratos recuperados (~90%), Tabla 68. Sin embargo, el pretratamiento con ozono en este estudio se realizó en condiciones suaves de pretratamiento y simultáneamente se puede llevar a cabo la recuperación de fósforo.

Por otra parte, el número de estudios centrados en la recuperación de fósforo de la biomasa de microalgas es limitado. Por lo general, las materias primas utilizadas son lodos de depuración o aguas residuales. Las posibles soluciones técnicas para la recuperación de fósforo a partir de aguas residuales municipales y lodos de depuración son precipitación de estruvita, recuperación de soluciones de fósforo con base en químicos y la incineración de lodos, para llevar a la recuperación de fósforo de cenizas de monoincineración. Desafortunadamente, estas soluciones actualmente se consideran químicamente, energéticamente y operacionalmente intensivas, y no ecológicamente sostenibles [328]. En comparación con los estudios previos informados en la Tabla 68, el pretratamiento secuencial sugerido en este estudio logró una mayor recuperación de fósforo, excepto en comparación con el método de digestión hidrotérmica. No obstante, en el estudio reportado por Deng y colaboradores [329], se aplicó un pretratamiento de digestión hidrotérmica para recuperar solo fósforo de las microalgas. Los resultados presentados en la Tabla 68 muestran que el pretratamiento combinado alcanzó mayor eficiencia de recuperación de fósforo, que métodos que recuperan fósforo directamente del agua residual. Con los beneficios adicionales de la producción de biomasa y obtención de biocombustibles con base en biomasa de microalgas.

## 5. Resultados y Discusión

**Tabla 68.** Sumario y comparación de casos de estudio de recuperación de fósforo de bioma de microalgas con este estudio.

Biocomponente recuperado	Proceso	Especie	Eficiencia	Referencia
<b>Carbohidratos</b>	Hidrólisis acida	<i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i>	90% carbohidratos	[331]
	Hidrólisis acida	<i>Scenedesmus sp.</i>	93% carbohidratos	[332]
	Pretratamiento hidrotermico	<i>Microcystis</i>	97.4% carbohidratos	[333]
<b>Fósforo</b>	O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /MW	Lodos activados	4 g P/kg lodo	[334]
	Digestión hidrotermica	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	9.7 g P/kg biomasa	[330]
	Fermentación alcalina	Agua residual	1.85 mg P/L agua residual	[335]
<b>Lípidos y carbohidratos</b>	Ozono y ultrasonido	Cultivo mixto de microalgas	59% lípidos y 81% carbohidratos	[336]
<b>Lípidos, proteínas, carbohidratos y fósforo</b>	Ultrasonido y ozono	Consorcio D	91.5% proteínas, 68% lípidos, 84.2% carbohidratos y 57.5% TP. 7.1 g P/kg biomasa, 4.8 mg P/L agua residual	<b>Este estudio</b>
		Consorcio S	91% proteínas, 89% lípidos, 62% carbohidratos y 75% TP. 8.9 g P/kg biomasa	<b>Este estudio</b>

# CONCLUSIONES

### 6. CONCLUSIONES

#### Pretratamiento de biomasa con ultrasonido u ozono

- El pretratamiento de biomasa de microalgas con ultrasonido indujo la disrupción celular, liberación de proteínas a la fase acuosa y mejoro la extracción de lípidos de la biomasa. El pretratamiento con ozono indujo la liberación y despolimerización de carbohidratos de biomasa de microalgas.
- Las células de microalga del consorcio D (*Desmodesmus sp.*) mostraron una pared celular más resistente a ambos pretratamientos, ultrasonido y ozono, en comparación con las células de microalga del consorcio S (*Scenedesmus obliquus*).
- Ambos pretratamientos, ultrasonido y ozono, intensificaron los procesos de extracción de lípidos, proteínas y carbohidratos, ya que disminuyen hasta en 90% el gasto de solventes y productos químicos y en 95% el tiempo de extracción. Además, incrementan considerablemente la calidad de los lípidos extraídos para la producción de biodiesel.
- El diseño de experimentos mediante superficie de respuesta nos permite encontrar las condiciones experimentales a las cuales se obtienen la máxima recuperación de biocomponentes. Además, permite conocer el efecto de cada parámetro experimental estudiado en la recuperación de biocomponentes para así maximizar su recuperación.

#### Identificación de proteínas y efecto del pretratamiento en la fracción proteica de la biomasa

- La identificación de las proteínas presentes en la biomasa de los consorcio D y S (*Desmodesmus sp.* y *Scenedesmus obliquus*) nos permite darle un valor agregado a la fracción proteica de cada tipo de biomasa. Ya que según la literatura estas proteínas puede tener importantes aplicaciones como tratamiento de infecciones por micobacterias y como biomarcadores para detectar suelo contaminado con Hg.
- Ambos pretratamiento, ultrasonido y ozono, mejoraron las propiedades térmicas de la fracción proteica de la biomasa de microalga, para la producción de bioplásticos. Indujeron la disminución de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ), entre 20 y 100 °C, así como la disminución de la concentración de grupos disulfuro y el aumento de la concentración de grupos hidroxilo.

#### Obtención de bioplasticos y biocompositos con base en biomasa de microalgas

- La pared celular de las microalgas jugó un papel importante en la obtención tanto de bioplásticos como de biocompositos. La pared celular de las microalgas del consorcio D (*Desmodesmus sp.*) evita la interacción entre las proteínas de la biomasa y el glicerol en el caso de bioplasticos, y las proteínas de biomasa y el PCL en el caso de biocompositos, a pesar del pretratamiento de la biomasa. Por lo tanto, en el caso de biocompositos, fue necesario tener un contenido mínimo de PCL en la mezcla para mejorar las propiedades viscoelásticas de los materiales obtenidos.



---

## 6. Conclusiones

---

- La barrera que ejerce la pared celular durante el proceso de obtención de los materiales, induce que las propiedades viscoelásticas y mecánicas de los sistemas con base en biomasa del consorcio D disminuyan. Por lo tanto, los materiales que mostraron mejores propiedades viscoelásticas y mecánicas fueron los que se obtuvieron con base en biomasa del consorcio S.
- Los bioplásticos que se obtuvieron a partir de ambos tipos de biomasa mostraron propiedades viscoelásticas similares a los obtenidos con base en albúmina de huevo y otras especies de microalgas como *Spirulina plantesis* y *Chlorella vulgaris*. Además, mostraron una capacidad de absorción de agua de hasta 800%, lo que le da importantes aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales.
- Los biocompositos que se obtuvieron con base en ambos tipos de biomasa mostraron propiedades viscoelásticas similares a los obtenidos con base en biomasa de otras especies de microalgas como *Spirulina plantesis* y *Chlorella vulgaris*. Sin embargo, los biocompositos que se obtienen en este estudio contienen 45% menos bioplástico sintético.

### **Obtención de membranas por electrohilado con base en proteínas de microalga**

- Ninguna de las fibras de electrohilado que se obtuvieron a partir de los sistemas AC/proteína del consorcio D presentó las propiedades necesarias para llevar a cabo un ensayo de tracción, lo que reduce su área de aplicación. Sin embargo, el pretratamiento de biomasa con ozono favoreció el proceso de electrohilado de las proteínas, debido a que promueve la disminución de su peso molecular en mayor medida que el pretratamiento con ultrasonido (a las condiciones experimentales estudiadas).
- Las membranas que se obtuvieron con base en PEO/proteína de biomasa del consorcio S pretratada con ultrasonido, fueron las que mostraron mejores propiedades mecánicas en comparación con las que se obtienen con base en proteínas de biomasa pretratada con ozono y sin pretratamiento.
- El esfuerzo máximo de la membrana incremento al doble con la adición de proteína de biomasa pretratada con ozono en una concentración de 0.75%, en comparación con el PEO. El incremento en las propiedades mecánicas se atribuye a la adición de grupos hidroxilo y aumento en la concentración de grupos sulfhidrilo durante el pretratamiento. El aumento en la concentración de estos grupos favorece la formación de entrecruzamientos.
- El pretratamiento biomasa del consorcio S con ozono, por otra parte, induce la reducción de las propiedades mecánicas de las membranas de electrohilado. El pretratamiento con ozono también produce el aumento en la concentración de grupos sulfhidrilo en la estructura de las proteínas. Sin embargo, favorece en mayor medida la adición de grupos hidroxilo, lo que deriva en la formación de entrecruzamientos y de enlaces por puente de hidrogeno. Estas fuertes interacciones formadas durante el proceso inducen una reducción de sus propiedades mecánicas.

### **Obtención de membranas por electrohilado con base en proteínas de microalga**

- El pretratamiento combinado de ultrasonido y ozono induce disrupción celular, la liberación de las proteínas al medio acuoso, facilita la extracción de lípidos y promueve la despolimerización de carbohidratos. Incrementa la calidad de lípidos y carbohidratos recuperados y evita el uso de compuestos químicos para la recuperación de proteínas, carbohidratos y fósforo. Además, los procesos de pretratamiento y recuperación de biocomponentes y fósforo se llevan a cabo a condiciones no intensivas, lo que puede disminuir el gasto de energía y costo de los procesos.

# PRODUCTOS GENERADOS

### Productos generados

#### Estancias de investigación

1. Facultad de Ciencias, Agricultura e Ingeniería, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne, UK. Bajo la dirección de la Dra. Sharon Velásquez-Orta. Septiembre-Noviembre, 2017.
2. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Sevilla, España. Bajo la dirección del Dr. Antonio Guerrero Conejo. Abril-Agosto 2019.

#### Congresos internacionales

1. Viability of protein-based plastics from *Desmodesmus sp.* and *Scenedesmus obliquus* after ozone or ultrasound pretreatment. 2nd Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts and Environmental Sustainability Conference, Sitges, España. 16-19 Septiembre 2018.
2. Biorefinery process intensified by ultrasound and ozone for lipids, proteins, carbohydrates and phosphorus recovery from microalgae biomass cultivated in wastewater. Second International Process Intensification Conference. Leuven, Belgica. 27-29 Mayo 2019.
3. Ultrasound and ozone sequential pretreatment process to recover carbohydrates and phosphorus from *Desmodesmus sp.* biomass cultivated in wastewater. IWA Conference on Algal Technologies and Stabilization Ponds for Wastewater Treatment and Resource Recovery-IWAlgae 2019, Valladolid, España. 1-2 Julio 2019.

#### Artículos publicados

- 1.- R.M. González Balderas, S.B. Velásquez-Orta, I. Valdez-Vázquez, M.T. Orta Ledesma. Intensified recovery of lipids, proteins, and carbohydrates from wastewater-grown microalgae *Desmodesmus sp.* by using ultrasound or ozone, *Ultrasonic Sonochemistry*. 62 (2020) 104852. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104852>

#### Artículos en proceso de publicación

1. R.M. González-Balderas, S.B. Velásquez-Orta, M.T. Orta Ledesma, Process intensification by dual ultrasound and ozone pretreatment for lipids, proteins, carbohydrates and phosphorus recovery from microalgae biomass cultivated in wastewater, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. En proceso de revisión.
2. R.M. González-Balderas, S.B. Velásquez-Orta, I. Valdez-Vazquez, M.T. Orta Ledesma, Ultrasound and ozone sequential pretreatment process to recover carbohydrates and phosphorus from *Desmodesmus sp.* biomass cultivation in wastewater, *Water Science and Technology*. En proceso de revisión.

# BIBLIOGRAFÍA

### 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mabee, W.E., Gregg, D.J., Sanddler, J.N., Assessing the emerging biorefinery sector in Canada, *Appl. Biochem. Biotech.* (2005) 765-768.
- [2] Nigam, P.S., Singh, A., Production of liquid biofuels from renewable resources, *Prog. Ener. Combust.* 37 (2010) 52-68.
- [3] Velazquez-Orta, S.B., Garcia-Estrada, R., Monje-Ramirez, I., Harvey, A., Orta-Ledesma, M.T., Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and FAME recoveries, *Biomass Bioener.* 70 (2014) 356-363.
- [4] Slingh, A., Sting, O.I., A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels, *Appl. Ener.* (2011) 3548-3555.
- [5] Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., An outlook on microalgal biofuels, *Science* (2010) 796-799.
- [6] Weyer, K.M., Bush, D.R., Darzins, A., Willson, B.D., Theoretical maximum algal oil production, *Bioener.* (2010) 204-213.
- [7] Carioca, J.O.B., Hiluy Filho, J.J., Leal, M.R.L.V., Macambira, F.S., The hard choice for alternative biofuels to diesel in Brazil, *Biotechnol. Adv.* (2009) 1043-1050.
- [8] Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., Posewitz, M.C., Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production, *Eukaryotic Cell* (2010) 16.
- [9] Chen, M., Tang, H.Y., Ma, H.Z. Holland, T.C., Ng, K.Y.S, Salley, S.O., Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*, *Biores. Technol.* (2011) 1649-1655.
- [10] Brennan, L., Owende, P., Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sustain. Ener. Rev.* 14 (2010) 557–577.
- [11] Lam, G.P., Vermuë, M.H., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H., Van den Berg, C., Multi product microalgae biorefineries: From concept towards reality, *Trends in Biotech.* 36 (2018) 216–227.
- [12] Miranda, J.R., Passarinho, P.C., Gouveia, L., Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalgae for bioethanol production, *Biores. Technol.* 104 (2012) 342–348.
- [13] Natarajan, R., Ang, W.M., Chen, X., Voigtman, M., Lau, R., Lipid releasing characteristics of microalgae species through continuous ultrasonication, *Biores. Technol.* 158 (2014) 7–11.
- [14] Garoma, T., Janda, D., Investigation of the effects of microalgal cell concentration and electroporation, microwave and ultrasonication on lipid extraction efficiency, *Renew. Energy* 86 (2016) 117–123.
- [15] Cheeseman, K.H., Slater, T.F., An introduction to free radical biochemistry, *British Medical Bulletin* 49 (1993) 481–493.
- [16] Moroney, J.V., Ynalvez, R.A., *Algal Photosynthesis*. John Wiley & Sons, 2009.
- [17] Cheng, K.C., Ogden, K.L., *Algal Biofuels: The Research [EB/OL]*. Marzo 2011. [www.aiche.org/cep](http://www.aiche.org/cep).
- [18] Wang, G.Y., Wang X., Liu, X.H., Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation, *J. Integr. Plant. Biol.*, (2011) 246-252.
- [19] Amaro, H. M., Guedes, A.C., Malcata, F.X., Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, *Appl. Ener.* 88 (2011) 3402-3410.
- [20] Christi, Y., Biodiesel from microalgae, *Biotechnolgy Advances*, (2007) 294-306.

---

## 7. Bibliografia

---

- [21] Hong-Wei, Y., I-Chen, H., Chun-Yen, C., Shih-Hsin, Ho, Duu-Jong L., Jo-Shu, C., Microalgae-based biorefinery-From biofuels to natural products, *Biores. Technol.* 135 (2013) 166-174.
- [22] Sarkar, P., Bosneaga, E., Auer, M., Plant cell walls throughout evolution:towards a molecular understanding of their design principles, *J. Exp. Bot.* (2009) 3615-3635.
- [23] Alcaine, A.A., Biodiesel from microalgae. Hogskolan sweden: Royal School of technology Kungliga Tekniska, (2010).
- [24] Khozin-Goldberg, I., Bigogno, C., Shrestha, P., Cohen, Z., Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incise* (Trebouxiophyceae), *J. Phycol.* (2002) 991-994.
- [25] Sharma, K.K., Schuhmman, H., Schenk, P.M., High lipid induction in microalgae for biodiesel production, *Ener.* (2012) 1532-1553.
- [26] Klass, D.I., Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemical. Elsevier academic Press, (1998).
- [27] Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* (2010) 217-232.
- [28] Chen, W.H., Lin, B.J., Huang, M.Y., Chang, J.S., Thermochemical conversion of microalgal biomass into biofuels: a review, *Bioresour. Technol.* 184 (2015) 314–327.
- [29] Christaki, E., Florou-Paneri, P., Bonos, E., Microalgae: a novel ingredient in nutrition, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 62 (2011) 794–799.
- [30] Apt, K.E., Behrens, P.W., Commercial developments in microalgal biotechnology, *J. Phycol.* (1999) 215-226.
- [31] Estevez, J.M., Kieliszewski, J.M., Khitrov, N., Somerville, C., Characterization of synthetic hydroxyproline-rich proteoglycans with arabinogalactan protein and extensin motifs in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* (2006) 458-470.
- [32] Chen, C.Y., Zhao, X.Q., Yen, H.W., Ho, S.H., Microalgae-based carbohydrates for biofuel production, *Biochemical Engin. J.* (2013) 1-10.
- [33] Yamada, T., Sakaguchi, K., Comparative studies on *Chlorella* cell walls-induction of potoplast formation, *Arch. Microbiol.* (1982) 10-13.
- [34] Metting, F.B., Biodiversity and application of microalgae, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (1996) 477-489.
- [35] Tan, L., Eberhard, S., Pattathil, S., Warder, C., Glushka, J., Yuan, C., Hao, Z., Zhu, X., Avci, U., Miller, J.S., Baldwin, D., Pham, C., Orlando, R., Darvill, A., Hahn, M.G., Kieliszewski, M.J., Mohnen, D., An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein, *Plant Cell* (2013) 270-287.
- [36] Tredeci, M.R., *Mass production of microalgae: photobioreactors*. Blackwell, Oxford: Richmond A, 2004.
- [37] Borowitzka, M. A., Moheimani, N.R., *Algae for Biofuels and Energy*. Springer, 2013.
- [38] Cabanelas, I.T.D., Arbib, F.A., Souza, C.O., Perales, J.A., Almeida, P.F., From waste to energy: microalgae production in wastewader and glycerol, *Appl. Ener.* (2013) 283-290.
- [39] Clarens, A.F., Resurrección, E.P., White, M.A., Colosi, L.M., Enviromental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstock, *Environ. Sci. Technol. Mar.* (2010) 1813-1819.

## 7. Bibliografía

---

- [40] U.S. Environmental Protection Agency, EPA. Municipal nutrient removal technologies reference document, Vol. 2 . *EPA 832-R-08-006*, **2008**.
- [41] Preveenkumar, R., Kim, B., Choi, E., Lee, K., Park, J.Y., Lee, J.S., Lee, Y.C., Oh, Y.K., Improved biomass and lipid production in a mixtropic culture of *Chlorella* sp. KR-1 with addition of coal-fired flue-gas, *Bioresour. Technol.* (2014) 500-505.
- [42] Shin, D.Y., Cho, H.U., Utomo, J.C., Xu, Y.N., Choi, X., Park, J.M., Biodiesel production from *Scenedesmus bijuga* grown in anaerobically digested food wastewater effluent, *Bioresour. Technol.* (2014) 215-221.
- [43] Oswald, W.J. Micro-algae and wastewater treatment. En *Micro-algal Biotechnology*, de Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., 305-328. Cambridge Univ.: Cambridge Univ. Press, **1998**.
- [44] Christenson, L., Sims, R., Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts, *Biotechnol. Advan.* (2011) 686-702.
- [45] Heidrich, E.S., Curtis, P.T., Dolfing, J., Determination of the internal chemical energy of wastewater, *Environ. Sci. Technol.* (2011) 827-832.
- [46] Bozbas, K., Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union, *Renew. Sustain. Energy Rev.* (2008) 542-552.
- [47] Brányiková, I., Marsáľková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., Vítová, M., Microalgae-novel highly efficient starch producers, *Biotechnol. Bioeng.* (2011) 946-948.
- [48] Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae, *Appl. Ener.* (2011) 3331-3335.
- [49] Ullah, K., Ahmad, M., Sharma, V.K., Lu, P., Harvey, A., Zafar, M., Sultana, S., Anyanwu, C.N., Algal biomass as a global source of transport fuels: Overview and development perspective, *Progress in Natural Science Material International* (2014) 329-339.
- [50] Fehrenbach H, Giegerich J, Reinhardt G, Schmitz J, Sayer U, Gretz M, et al. Criteria for a Sustainable Use of Bioenergy on a Global Scale. Germany: Federal Environment Agency; **2008**; 245 (prepared by the Institute for Energy and Environmental Research (IFEU), Heidelberg).
- [51] Chynoweth, D.P., Owens, J.M., Legrand, R., Renewable methane from anaerobic digestion of biomass, *Renew. Energy* 22 (2001) 1–8.
- [52] Reijnders, L., Huijbregts, M.A.J., Biofuels for Road Transport: A Seed to Wheel Perspective. London: Springer-Verlag; **2009**.
- [53] Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable, *Biotechnol. Adv.* (2009) 409-416.
- [54] Grobbelaar, J.U., Algal nutrition. En *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, De Richmond, A., Wiley-Blackwell, **2004**.
- [55] Burton, T., Lyons, H., Lerat, Y., Stanley, M., Rasmussen, M.B., A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland Dublin, *Sustainable Energy Ireland* (2009) 88.
- [56] WEF. *The Future of Industrial Biorefineries* (2010).  
[http://www3.weforum.org/docs/WEF\\_FutureIndustrialBiorefineries\\_Report\\_2010.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_FutureIndustrialBiorefineries_Report_2010.pdf).
- [57] Demirbas, A. *Biorefineries: for Biomass Upgrading Facilities*. Heidelberg-London-New York: Springer Dordrecht, **2010**.
- [58] Kamm, B., Xie, H., Gathergood, N., 1-26. Hoboken, New Jersey: Wiley, **2013**.
- [59] Kamm, B., Kamm, M., Gruber, P.R., Kromus, P.S., Biorefineries-Industrial processes and products, Wiley-VCH, **2006**.



---

## 7. Bibliografia

---

- [60] Cherubini, F., The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals, *Energy Conversion and Management* (2010) 1412-1421.
- [61] Yew, G.Y., Lee, S.Y., Show, P.L., Tao, Y., Law, C.L., Nguyen, T.T.C., Chang, J.S., Recent advances in algae biodiesel production: From upstream cultivation to downstream processing, *Bioresour. Technol. Rep.* 7 (2019) 1-10.
- [62] James, S.C., Janardhanam, V., Hanson, D.T., Simulating pH effects in an algal growth hydrodynamics model, *J. Phycol.* 49 (2013) 608–615.
- [63] Baba, M., Shiraiwa, Y., Biosynthesis of Lipids and Hydrocarbons in Algae, *Intechopen, United Kingdom*, (2013) 331–356.
- [64] Lucker, B.F., Hall, C.C., Zegarac, R., Kramer, D.M., The environmental photobioreactor (ePBR): an algal culturing platform for simulating dynamic natural environments, *Algal Res.* 6 (2014) 242–249.
- [65] Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Woong Kim, C., Park, M.S., Yang, Ji-Won, Methods of downstream processing or the production of biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Advan.* 6 (2013) 862-876.
- [66] Popper, Z., Ralet, M.-C., Domozych, D., Plant and algal cell walls: diversity and functionality, PREFACE 114 (2014) 1043–1048.
- [67] Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 233–239
- [68] Granados, M.R. Gómez, C., Fernández-Sevilla, J.M., Molina Grima, E., Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae, *Bioresour. Technol.* 118 (2012) 102–110.
- [69] Alam, A., Vandamme, D., Chun, W., Zhao, X., Fourbert, I., Wang, Z., Muylaert, K., Yuan, Z., Bioflocculation as an innovative harvesting strategy for microalgae, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 15 (2016) 573–583.
- [70] Gerardo, M.L. Zanain, M.A., Lovitt, R.W., Pilot-scale cross-flow microfiltration of *Chlorella minutissima*: a theoretical assessment of the operational parameters on energy consumption, *Chem. Eng. J.* 280 (2015) 505–513.
- [71] Bilad, M.R. Vandamme, D., Fourbert, I., Muylaert, K., Vankelecom, I.F.J., Harvesting microalgal biomass using submerged microfiltration membranes, *Bioresour. Technol.* 111 (2012) 343–352.
- [72] Vandamme, D., Beuckels, A., Muylaert, K., Inhibition of alkaline flocculation by algal organic matter for *Chlorella minutissima*, *Water Res.* 88 (2016) 301–307.
- [73] Günerken, E., Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H., Cell disruption for microalgae biorefineries, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 243–260.
- [74] Schwenzfeier, A., Wierenga, P.A., Gruppen, H., Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis sp.*, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 9121–9127.
- [75] Harrison, S.T.L., Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products, *Biotechnol. Advan.* (1991) 217-240.
- [76] Northcote, D.H., Golding, K.J., The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*, *Biochem. J.* (1958) 391-397.
- [77] Doucha, J., Livansk, K., Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella cells* in various types of homogenizers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2008) 431-440.

---

## 7. Bibliografía

---

- [78] Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresour. Technol.* (2010) S75-S77.
- [79] González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: focus on biomethane production, *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 6 (2012) 205–218.
- [80] Dunker, S., Wilhelm, C., Cell wall structure of coccoid green algae as an important trade-off between biotic interference mechanisms and multidimensional cell growth, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 719.
- [81] Kuan-Yeow, L., Duu-Jong, T., Joo-Hwa, Lee, Tse-Min, Jo-Shu C., Microalgal drying and cell disruption—Recent advances, *Biores. Technol.* (2015) 258-266.
- [82] Munir, N., Sharif, N., Nazi, S., Saleem, F., Manzoor, F., Harvesting and processing of microalgae biomass fractions for biodiesel production—a review, *Sci. Technol.* (2013) 235-243.
- [83] Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.W., Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges, *J. R. Soc. Interface.* (2010) 703-726.
- [84] Gerde, A., Montalbo-Lomboy, M., Yao, L., Grewell, R., Wang, T., Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment, *Biores. Technol.* (2012) 175-181.
- [85] Schwede, S., Kowalczyk, A., Gerber, M., Span, R., Influence of different cell disruption techniques on mono digestion of algal biomass, *World Renewable Energy Congress.* (2011) 41-47.
- [86] Betts, G.D., Williams, A., Oakley, R.M., Ultrasonic standing waves: inactivation of foodborne microorganism using power ultrasound, *Encyclopedia of food microbiology* (2014) 659-664.
- [87] Mercer, P., Armenta, R.E., Developments in oil extraction from microalgae, *Eur. J. Lipid* (2011) 539-547.
- [88] Neis, U., Nickel, K., Tiehm, A., Enhancement of anaerobic sludge digestion by ultrasonic disintegration, *Water Sci. Technol.* (2000) 73-80.
- [89] Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P., *Ultrason. Sonochem.* (2008) 898-902.
- [90] Mason, C.B., Matthews, S., Bricker, T.M., Moroney, J.V., Simplified procedure for the isolation of intact chloroplasts from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiology.* (1991) S91-S95.
- [91] Velasquez-Orta, S.B., Garcia-Estrada, R., Monje-Ramirez, I., Harvey, A., Orta Ledesma, M.T., Microalgae harvesting using ozoflotation: effect on lipid and FAME recoveries, *Biomass and Bioener.* 70 (2014) 356–363.
- [92] Nguyen, M.T., Choi, S.P., Lee, J., Sim, S.J., Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production, *J. Microbiol. Biotechnol* (2009) 161-166.
- [93] Betzer, N, Argaman, Y., Kott, Y., Effluent treatment and algae recovery by ozone-induced flotation, *Water Res.* 14 (1980) 1003-1009.
- [94] Hoeghe, S.J., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B.C., Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment, *Environ Health Perspect.* (2002) 1127-1132.

## 7. Bibliografía

---

- [95] González Valeriano Maria Teresa, Efecto del ozono en la liberación de proteínas surfactantes y en ácidos grasos, Tesis para optar por el grado de maestro en ingeniería, (2013) 67.
- [96] Plummer, J.D., Edzwald, J.K., Effects of chlorine and ozone on algal cell properties and removal of algae by coagulation, *Journal of Water Supply: Research and Technology—AQUA*, (2002) 307-318.
- [97] Dávila, C.B. Obtención de bioetanol a partir de biomasa microalgal cultivada en agua residual empleando ozoflotación como metodo de cosecha. CD de Mexico: Universidad Nacional Autonoma de México, 2016.
- [98] Cardeña, R., Moreno, G., Bakonyi, P., Buitrón, G., Enhancement of methane production from various microalgae cultures via novel ozonation pretreatment, *Chem. Eng. J.* 307 (2017) 948–954.
- [99] Suarez Garcia, E., Suarez Ruiz, C.A., Tilaye, T., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H., van den Berg, C., Fractionation of proteins and carbohydrates from crude microalgae extracts using an ionic liquid based-aqueous two phase system, *Sep. Purif. Technol.* 204 (2018) 56–65.
- [100] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [101] Bligh, E.G., Dyer, W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1957) 911–917.
- [102] Naghdi, F.G., González, L.M., Chan, W., Mschenk, P.M., Progress on lipid extraction from wet algal biomass for biodiesel production, *Microbial Biotechnol.* 9 (2016) 718-726.
- [103] Kadam, S.U.; Álvarez, C.; Tiwari, B.K.; O'Donnell, C.P. Extraction and characterization of protein from irish brown seaweed *ascophyllum nodosum*, *Food Res. Int.* (2016).
- [104] McCourt, R.M.; Delwiche, C.F.; Karol, K.G. Charophyte algae and land plant origins, *Trends Ecol. Evol.* 19 (2004) 661–666.
- [105] Fleurence, J. The enzymatic degradation of algal cell walls: A useful approach for improving protein accessibility, *J. Appl. Phycol.* 11 (1999) 313–314.
- [106] *J. Appl. Phycol.* 11, (1999) 313–314
- [107] Harun, R., Danquah, M.K., Forde, G.M., Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2010) 199–203.
- [108] Van de Vyver, S., Peng, L., Geboers, J., Schepers, H., Clippel, F., Gommès, G.C., Goderis, B., Jacobs, P.A., Sels, B.F., Sulfonated silica/carbon nanocomposites as novel catalysts for hydrolysis of cellulose to glucose, *Green Chem.* 12 (2010) 1560–1563.
- [109] Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M. Leemhuis, H. Dijkhuizen, L., Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family, *J. Biotechnol.* 94 (2002) 137–155.
- [110] Cara, C., Moya, M., Ballesteros, I., Negro, M.J., Gonzalez, A., Ruiz, E., Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass, *Process Biochem.* 42 (2007) 1003–1009.
- [111] Mussatto, S.I., Dragone, G., Guimaraes, P.M.R., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L., Teixeira, J.A., Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 817–830.
- [112] Okuda, K., Oka, K., Onda, A., Kajiyoshi, K., Hiraoka, M., Yanagisawa, K., Hydrothermal fractional pretreatment of sea algae and its enhanced enzymatic hydrolysis, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008) 836–841.

## 7. Bibliografía

---

- [113] Verbeek, J.R., Van der Beg, L.E., Extrusion Processing and Properties of Protein-Based Thermoplastics. *Macromolecular Journals*, (2010) 10-21.
- [114] Dill, K. A., Shortle, D., *Annu. Rev. Biochem.* (1991) 795.
- [115] Devlin, T.M. *Textbook of Biochemistry: With Clinical Correlations*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2011.
- [116] Ringe, D., Petsko, G.A., *Biophys. Chem.* (2003) 667.
- [117] Soto-Sierra, L., Stoykova, P., Zivko, L.N., Extraction and fractionation of microalgae-based protein products, *Algal Res.* 36 (2018) 175-179.
- [118] Nakai, S., Modler, H.W., *Food Proteins: Properties and Characterization*, John Wiley & Sons, 1996.
- [119] J. Ruiz, J., Olivieri, G., Vree, J. de, Bosma, R., Willems, P., Reith, J.H., Eppink, M.H., Kleinegris, D.M., Wijffels, Barbosa, M.J., Towards industrial products from microalgae, *Energy Environ. Sci.* 9 (10) (2016) 3036–3043.
- [120] Chua, E.T., Schenk, P.M., A biorefinery for Nannochloropsis: Induction, harvesting, and extraction of EPA-rich oil and high-value protein, *Bioresour. Technol.* 244 (2017) 1416–1424.
- [121] Vanthoor-Koopmans, M., Cordoba-Matson, M.V., Arredondo-Vega, B.O., Lozano-Ramirez, C., Garcia-Trejo, J.F., Rodriguez-Palacio, M.C., *Microalgae and cyanobacteria production for feed and food supplements*, *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*, Springer (2014) 253–275.
- [122] Linares, L.C.F., Falfan, K.A.G., Ramirez-Lopez, C., *Microalgal biomass: a biorefinery approach*, *Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy*, In Tech, 2017.
- [123] Thomas, S., Durand, D., Chassenieux, C., Jyotishkumar, P., *Handbook of Biopolymer-base Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks*. Wiley-VCH, Verlag GmbH, Germany, 2013.
- [124] Pommet, M., Redl, a., Morel, M.H., Guilbert, S., Study of wheat gluten plasticization with fatty acids *Polymer*, (2003) 115-112.
- [125] Gennadios, A., *Protein Based Films and Coatings*. CRC press, New York, 2002, pp.66–115.
- [126] Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S., Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chem.* (1998) 1-9.
- [127] Savary, C., Colonna, P., Della Valle, G., Matériaux d'emballage à base d'amidons et de leurs dérivés. *Ind. Céréales*, (1993) 17-29.
- [128] Rouilly, A., Orliac, O., Silvestre, F., Rigal, L., *Thermochim. Acta*, (2003) 195.
- [129] Bier, M., Verbeek, J., Lay, C., Thermal Transition and Structural Relaxions in Protein-Based Thermoplastics. *Macromolecular Journals*, (2013) 524-539.
- [130] Van Krevelan, D. W., *Properties of Polymers, Their Estimation and Correlation with Chemical Structure*. Amsterdam, 1976.
- [131] Cherian, G., Gennadios, A., Weller, C., Chinachoti, P., Thermomechanical behavior of wheat gluten films: Effect of sucrose, glycerin and sorbitol. *Cereal Chem.* (1995) 1-6.
- [132] Slade, L., Levine, H., *The Glassy State in Foods*. Loughborough, England: Nottingham University Press, 1993.
- [133] Strahm, B. *Cereal Foods World*, (1998) 621.
- [134] Guilbert, S., Cuq, B., Shrewsbury: Rapra Technology, 2005.
- [135] Giancola, C., De Sena, C., Fessas, D., Graziano, G., Barone, G., *Int. J. Biol. Macromol.* (1997) 193.

## 7. Bibliografía

---

- [136] Tang, C.H., Choi, S.M., Ma, C.Y., *Int. J. Biol. Macromol.*, (2007) 96.
- [137] Sowdhamini, R., Balaram, P., New Delhi/Berlin, New York: Narosa Publishing House/Springer, 1993.
- [138] Kitabatake, N., Tahara, M., Doi, E., *Agric. Biol. Chem.*, (1989) 1201.
- [139] Yan, Y.B., Wang, Q., He, H.W., Zhou, H.M., *Biophys. J.* (2004) 1682.
- [140] Farahnaky, A., Badii, F., Farhat, I.A., Mitchell, J.R., Hill, S.E., *Biopolymers*, (2005) 69.
- [141] De Graaf, L.A. *J. Biotechnol.* (2000) 299.
- [142] Bengoechea, C., Arrachid, A. Guerrero, A., Hill, S.E., Mitchell, J.R., *J. Cereal Sci.* 45 (2007) 275.
- [143] Rouilly, A., Me´riaux, A., Geneau, C., Silvestre, F., Rigal, L., *Polym. Eng. Sci.* (2006) 1635.
- [144] Tolstoguzov, V.B. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1993) 417.
- [145] Hernandez-Izquierdo, V.M., Reid, D.S., McHugh, T.M., Berrios, J.D.J., Krochta, J.M., *J. Food Sci.* (2008) 169.
- [146] Matveev, Y., Grinberg, V., Tolstoguzov, V., The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, foods and seeds. *Food Hydrocoll.* (2000) 425-437.
- [147] Gioia, L. Di., Guilbert, S., *J. Agric. Food Chem.* (1999) 1245.
- [148] Liu, D., Zhang, L., *Macromol. Mater. Eng.* (2006) 820.
- [149] Orliac, O., Silvestre, F., Rouilly, A., Rigal, L., *Ind. Eng. Chem. Res.* (2003) 1674.
- [150] Brauer, S., Meister, F., Gottlober, R.P., Nechwatal, A., *Macromol. Mater. Eng.* (2007) 1976.
- [151] Jerez, A., Partal, P., Martı´nez, I., Gallegos, C., Guerrero, A., *J. Food Eng.* (2007) 608.
- [152] Hernandez-Izquierdo, V.M., Krochta, J.M., *J. Food Sci.* (2008) 30.
- [153] Z´arate-Ramı´rez, L.S., Romero, A., Martı´nez, I., Bengoechea, C., Partal, P., Guerrero, A., Effect of aldehydes on thermomechanical properties of gluten-based bioplastics, *Food Bioprod. Process.* 92 (2014) 20–29.
- [154] Perez, V., Felix, M., Romero, A. Guerrero, A., Characterization of pea protein-based bioplastics processed by injection moulding, *Food Bioprod. Process.* 97 (2016) 100–108.
- [155] Jansens, J.K.A., Hong, N.V., Telen, L., Brijs, K., Lagrain, B., Van Vuure, A.W., Van Acker, K., Verpoest, I., Van Puyvelde, P., Goderis, B., Smet, M., Delcour, J.A., Effect of molding conditions and moisture content on the mechanical properties of compression molded glassy, wheat gluten bioplastics, *Ind. Crops Prod.* 44 (2013) 480–487.
- [156] Suyatma, N.E., Tighzert, L., Copinet, A., Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3950–3957.
- [157] Peressini, D., Peighambaroust, S.H., Hamer, R.J., Sensidoni, A., van der Goot, A.J., Effect of shear rate on microstructure and rheological properties of sheared wheat doughs. *J. Cereal Sci.* 48 (2008) 426–438.
- [158] Singh, I., Chaitanya, S., Injection molding of natural reinforced composites, 273-287. En Thakur, V.K., Kessler, M.R., *Green Biorenewable Biocomposites From Knowledge to Industrial Applications*, Apple Academic Press, Inc. 2015.
- [159] Mekonnen, T.H., Misra, M., Mohanty, A.K., Processing, performance, and applications of plant and animal protein-based blends and their biocomposites, 201-235. En Misra, M., Pandey, J., Mohanty, A., *Biocomposites: Design and Mechanical Performance*. Woohed Publishing, 2015.
- [160] Sun, X., Kim, H.R., Mo, X., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1999) 117.

## 7. Bibliografia

---

- [161] Areas, J. A. G. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (1992) 365.
- [162] Mohammed, Z. H., Hill, S.E., Mitchell, J.R., *J. Food Sci.* (2000) 221.
- [163] Huang, H.C., Chang, T.C., Jane, J., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1999) 1101.
- [164] Doshi, J., Reneker, D.H., Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *J Electrostat.* 35 (1995) 151–60.
- [165] Li, D., Xia, Y.N., Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Adv Mater.* 16 (2004) 1151–70.
- [166] Reznik S.N., Yarin A.L., Theron, A., Zussman, E., Transient and steady shapes of droplets attached to a surface in a strong electric field, *J Fluid Mech.* 516 (2004) 349–77.
- [167] Shin, Y.M., Hohman, M.M., Brenner, M.P., Rutledge, G.C., Electrospinning: A whipping fluid jet generates submicron polymer fibers, *Appl Phys Lett.* 78 (2001) 1149–51.
- [168] Reneker, D.H., Yarin, A.L., Fong, H., Koombhongse, S., Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning, *J Appl. Phys.* 87 (2000) 4531–47.
- [169] Li, Y., Huang, Z.M., Lu, Y.D., Electrospinning of nylon terpolymer, *Eur Polym J.* 42 (2006) 1696–704.
- [170] Theron S. A, Zussman E. Yarin A.L. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions *Polymer* 45 (2004)2017–30.
- [171] Li D., Xia Y.N. ‘Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?’, *Adv Mater.* 16 (2004) 1151–70.
- [172] Li C. M., Vepari. C., Jin, H. J., Kim, H. J., Kaplan, D. L., Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials*, 27 (2006) 3115–24.
- [173] Sperling, L. H. *Introduction to physical polymer science*, 4th edition, Hoboken, NJ, USA 2006.
- [174] Fong, H., Chun, I., Reneker, D.H. Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer*, 40 (1999) 4585–92.
- [175] Lee, K.H., Kim, H.Y., Bang, H.J., Jung, Y. H., Lee, S.G., The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers *Polymer* 44 (2003) 4029–34.
- [176] Du, J., Zhang, X., Role of polymer-salt-solvent interactions in the electrospinning of polyacrylonitrile/iron acetylacetonate, *J Appl Polym Sci.* 109 (2008) 2935–41.
- [177] Choi J. S., Lee S. W., Jeong L., Bae S. H., Min B. C., Youk J. H., Park W. H., Effect of organosoluble salts on the nanofibrous structure of electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) *Int J Biol Macromol.* 34 (2004) 249–56.
- [178] Wannatong L, Sirivat A., Supaphol P., Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene, *Polym Int.* 53 (2004) 1851–9.
- [179] Jaworek A, Krupa A, Lackowski M, Sobczyk A T, Czech T, Ramakrishna S, Sundarrajan S., Pliszka D., Electrospinning and electrospraying techniques for nanocomposite non-woven fabric production, *Fibers and Textiles in Eastern Europe*, 17 (2009) 77–81.
- [180] Thomas V, Dean D R, Jose M V, Mathew B, Chowdhury S., Vohra Y.K., Aligned bioactive multi-component nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering’, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 631.
- [181] Robb, B., Lennox, B., The electrospinning process, conditions and control, 57-59. En Bosworth, L.A., Doenes, S., Electrospinning for tissue regeneration, Wood head Publishing Limited, 2011.

## 7. Bibliografía

---

- [182] Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao B.S., Chu B., Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes, *Polymer*, 43 (2002) 4403–12.
- [183] Macossay J, Marruffo A, Rincon R, Eubanks T., Kuang A., Effect of needle diameter on nanofiber diameter and thermal properties of electrospun poly(methyl methacrylate), *Polym Adv Technol*. 18 (2007) 180–3.
- [184] Yarin A. L., Koombhongse S., Reneker D.H., Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers, *J Appl Phys*. 89 (2001) 4836–46.
- [185] Druessedow C.J. *Pressure control system for the electrospinning process: non invasive fluid level detection using infrared and ultrasonic sensors*. MSc Thesis, University of Akron, (2008). [http://etd.ohiolink.edu/view.cgi?acc\\_num=akron1217275502](http://etd.ohiolink.edu/view.cgi?acc_num=akron1217275502).
- [186] Jeun J P, Kim Y H, Lim Y M, Choi J H, Jung C H, Kang P.H., Nho Y.C., Electrospinning of poly(l-lactide-co-d, l-lactide), *J Ind Eng Chem*. 13 (2007) 592.
- [187] Won K S, Ji H.Y., Won H.P., Preparation of ultrafine oxidized cellulose mats via electrospinning, *Biomacromolecules*, 5 (2004) 197–201.
- [188] Wang, L., Ryan, A.J., Introduction to electrospinning, 3-33. En *Electrospinning for tissue regeneration*, Wood head Publishing Limited, 2011.
- [189] Kenawy E R, Bowlin G L, Mansfield K, Layman J, Simpson D G, Sanders E.H., Wnek G.E., Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethyleneco-vinylacetate), poly(lactic acid) and a blend, *J Control Release*, 81 (2002) 57–64.
- [190] Cordell, D., S. White, y T. Lindström. *Sustain. Rev.* (2011) 1.
- [191] Salminen, R. *Geochemical atlas of Europe. P – Phosphorus, part 2*. 2006.
- [192] Nieminen, J. PHOSPHORUS RECOVERY AND RECYCLING FROM MUNICIPAL WASTEWATER SLUDGE. Aalto University, School of Science and Technology, Department of Civil and Environmental Engineering, May 7, 2010.
- [193] Survey., U.S. Geological. *Mineral commodity summaries 2010, Phosphorus*. United States Government Printing Office.
- [194] Cornel, P., y C. Schaum. Phosphorus recovery from wastewater: needs, technologies and costs. *Water Science and Technology*, 2009 1069-1076.
- [195] Van Kauwenbergh, S. *World Phosphate Reserves and Resources*. Washington, DC, USA: IFDC, 2010.
- [196] Ylinen, P. Requirements for recycled P from the perspective of fertiliser industry. Presentation in BALTIC 21 Phosphorus Management Practice. 2009.
- [197] Comission EU. *Comission of the European. Report from the commission to the council and the European parliament. Pursuant to Article 16 of Regulation (EC)No 648/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 ondetergents, concerning the use of phosp.* Brussels: COM(2007) 234 final, 2007.
- [198] Rayner-Canham, G., y T. Overton. *Descriptive Inorganic Chemistry*. USA: Craig Bleyer, , 2006.
- [199] Phosphate Forum of the Americas. Phosphate Facts. 4 de March de 2010. <http://www.phosphatesfacts.org/uses.asp>.
- [200] Schröder, J.J., D. Cordell, A.L. Smit, y A. Rosemarin. *Sustainable Use of Phosphorus; Technical Report Report 357 for Plant Research International*. The Netherlands: Wageningen University and Research Centre:Wageningen, 2010.
- [201] Parsons, S., y J. A. Smith. Phosphorus removal and recovery from municipal wastewaters. *Elements*, (2008) 109-112.

## 7. Bibliografia

---

- [202] *Production*. Stockholm, Sweden: Stockholm Environment Institute, **2004**.
- [203] Metcalf., y Eddy. *Wastewater Engineering - Treatment and reuse*. New York.: Mc Graw Hill, **2003**.
- [204] Gilbert, N. The disappearing nutrient. *Nature*, (**2009**) 716-718.
- [205] Neset, T.-S.S., y L. Andersson. Environmental Impact of Food Production and Consumption—From Phosphorus Leakage and Resource Depletion to Recycling. En *Water for Food*, de J. Förare, 99-108. Stockholm, Sweden: The Swedish Research Council Formas, **2008**.
- [206] Mäkelä, M. Requirements for nutrient removal at municipal wastewater treatment. *Vesitalous* (2004) 12-14.
- [207] Vesilind, P. A. *Wastewater Treatment Plant Design*. Alexandria, USA: IWA Publishing, **1998**.
- [208] Abdel-Raouf, N., A.A. Al-Homaidan, I.B.M. Ibraheem. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, (**2012**) 257-275.
- [209] Geider, R., J. La Roche. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* (**2002**) 1-17.
- [210] Sheng, J., R. Vannela, B.E. Rittmann. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* *Bioresour. Technol.* (**2011**) 1697-1703.
- [211] Takahashi, H., Uchimiya, H., Hihara. Y., Difference in metabolite levels between photoautotrophic and photomixotrophic cultures of *Synechocystis sp.* PCC 6803 examined by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *J. Exp. Bot.* (**2008**) 3009 - 3018.
- [212] Shastri, A.A., Morgan. J.A. Flux balance analysis of photoautotrophic metabolism. *Biotechnology*, (**2005**) 1617 - 1626.
- [213] Sterner, R.W., Elser. J.J., *Ecological Stoichiometry: the Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton, New Jersey.: Princeton University Press, **2002**.
- [214] Elser, J.J., Growth rate stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecol. Lett.*, (2003) 936-943.
- [215] Kim, W.K., R. Vannela, C. Zhou, C. Harto, Rittmann. B.E., Photoautotrophic nutrient utilization and limitation during semi-continuous growth of *Synechocystis sp.* PCC6803. *Biotechnol. Bioeng*, (**2010**) 553-563.
- [216] Gifford, M., J. Liu, B. Rittmann, R. Vannela, P., Westerhoff. Phosphorus recovery from microbial biofuel residual using microwave peroxide digestion and anion exchange. *water research*. (**2015**) 130-137.
- [217] de-Bashan, L.E., Bashan. Y., Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003) *Water Res.* (**2004**) 4222-4246.
- [218] Morse, G.K., S.W. Brett, J.A. Guy, Lester, V., phosphorus removal and recovery technologies. *Sci. Total Environ.*, (**1998**) 69-81.
- [219] Ittmann, B.E., B. Mayer, P. Westerhoff, Edwards, M., Capturing the lost phosphorus *Chemosphere*, **2011**.
- [220] Blocher, C., C. Niewersch, Melin.T., Phosphorus recovery from sewage sludge with a hybrid process of low pressure wet oxidation and nanofiltration. *Water Res.* (**2012**) 2009-2019.
- [221] Matyniaa, A., B. Wierzbowskaa, N. Hutnika, Mazienczuka, A. Separation of struvite from mineral fertilizer industry wastewater.» *Procedia Environmental Sciences*, (**2013**) 766 – 775.



## 7. Bibliografía

---

- [222] Valeriano-González, M.T., I. Monje-Ramírez, M.T. Orta-Ledesma, J. Gracia Fadrique, Velásquez-Orta, S.B. Harvesting microalgae using ozonoflotation releases surfactant proteins, facilitates biomass recovery and lipid extraction, *Biomass and Bioener.* 95 (2016) 109-115.
- [223] Safi, C. M. Charton, A. Ursu, C. Laroche, B. Zebib, P. Pontalier, Vaca-Garcia, C., Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments, *Algal Res.* 3 (2014) 55-60
- [224] Mirsiaghi, M., Reardon, K.F., Conversion of lipid-extracted *Nannochloropsis salina* biomass into fermentable sugars, *Algal Res.* 8 (2015) 145-152.
- [225] Birdsall, C.M. Jenkins, A.C. Spadinger, E., Iodometric determination of ozone, *Anal. Chem.* 24 (1952) 662–664.
- [226] Misha, S.K. Su, W.IFarooq, . W. Moon, M. Shrivastav, A. Park, M.S., Yang, J.W., Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method, *Biores. Technol.* 155 (2014) 330–333.
- [227] Uzun, H, Ibanoglu, E., Catal, H., Ibanoglu, S., Effects of ozone on functional properties of proteins, *Food Chem.* 134 (2012) 647-654.
- [228] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.
- [229] Kaluzny, M.A., Ducan, L.A., Merritt, M.V., Epps, D.E., Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns, *J. of Lipid Res.* 26 (1985) 135–140.
- [230] Faurobert, M., Pelpoir, E., Chaïb, J., Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues, in: Thiellement, H., Zivy, M., Damerval, C., Méchin, V., Plant Proteomics. Humana Press Inc. New Jersey, 2007, pp. 9-14.
- [231] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature.* 227 (1970) 680-685.
- [232] Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., Modification of Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87 (1978) 206–210.
- [233] Beveridge, T., Toma, S.J., Nakai, S., Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent. *J. Food Sci.* 39 (1974) 49–51.
- [234] Thannauer, T.W., Konishi, Y., Scheraga, H.A., Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Anal. Biochem.* 138 (1984) 181–188.
- [235] Cuadri, A.A., Romero, A., Bengoechea, C., Guerrero, A., The effect of carboxyl group content on water uptake capacity and tensile properties of functionalized soy protein-based superabsorbent plastics. *J. Polym. Environ.* (2018)1–11.
- [236] Krienitz, L., Bock, C., Dadheech, P., Proschold, T. Taxonomis reassessment of the genus Mychonastes including the description of eight new species. *Phycologia*, (2011) 89-106.
- [237] Yuan, C., Liu, J., Fan, Y., Ren, X., Hu, G., Li, F. Mychonastes afer HSO-3-1 as a potential new source of biodiesel. *Biotechnology for biofuels*, (2011) 2-8.
- [238] Feng, P., Deng, Z., Hu, Z., Wang, Z., Wang, Z., & Fan, L. Characterization of Chlorococcum pamirum as a pontential biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, (2014) 115-122.
- [239] X. Zhang, S. Yan, R.D. Tyagi, P. Drougi, R.Y. Surampalli, Ultrasonication assisted lipid extraction from oleaginous microorganisms, *Biores. Technol.* 158 (2014) 253-261.

## 7. Bibliografia

---

- [240] Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V., Kalil, S.J., Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design, *Biores. Technol.* 98 (2007) 1629–1634.
- [241] Yao, S., Mettu, S., Law, S.Q.W., Ashokkumar, M., Martin, G.J.O., The effect of high-intensity ultrasound on cell disruption and lipid extraction from high-solids viscous slurries of *Nannochloropsis sp.* biomass, *Algal Res.* 35 (2018) 341-348.
- [242] Harnedy, P.A., Fitzgerald, R.J., Bioactive proteins, peptides and amino acids from macroalgae, *J. Phycol.* 47 (2011) 218–232.
- [243] An, S.S., Field, T., Hegewald, E., Phylogenetic Relationships of Scenedesmus and Scenedesmus-like Coccoid Green Algae as Inferred from ITS-2 rDNA Sequence Comparisons. *Plant Biol.*, (1999) 418-428.
- [244] Purcell, D., Parson, S.A., Jefferson, B., The influence of ultrasound frequency and power, on the algal species *Mycrocystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Scenedesmus subspicatus* and *Melosira sp.* *Environ. Technol.* 34 (2013) 2477-2490.
- [245] Guschina, A. I., Harwood, J.L., Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, *Prog. in Lipid Res.* 45 (2006) 160-186, <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>.
- [246] Lang, I., New Fatty Acids, Oxylipins and Volatiles in microalgae. Georg-August-Universität zu Göttingen, (2007).
- [247] Travaini, R. Martín-Juárez, J. Lorenzo-Hernando, A. Bolado-Rodríguez, S., Ozonolysis: an advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited, *Biores. Technol.* 199 (2016) 2–12.
- [248] De Leeuw, J.W., and C. Largeau. "A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal and petroleum formation." In *J.W. de Leeuw, C. Largeau, A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal and petroleum formation. Principles and Applications.*, by M.M. Engel, 23-72. New York: J.W. de Leeuw, C. Largeau, A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal and petroleum formation, Plenum Press, 1993.
- [249] Blokker, P., S. Schouten, H. Van den Ende, J.D. De Leeuw, P.G. Hatcher, J.S. Sinninghe Damsté. Chemical structure of algaenan from the fresh water *Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Organ. Geochem.*, (1998) 1453-1468.
- [250] Freeman, B.A., Crapo, J.D., Biology of disease: free radicals and tissue injury, *Lab. Invest.* 47 (1982) 412–426.
- [251] Yap, B., Crawford, A., Dumsday, G.J., Scales, P.J., Martin, G.J., A mechanistic study of algal cell disruption and its effect on lipid recovery by solvent extraction, *Algal Res.* 5 (2014) 112–120
- [252] Bezerra, M.A., Costa Ferreira, S.L., Galvao Novaes, C., Pinto dos Santos, A.M., Souza Valasques, G., Ferreira da Mata Cerqueira, U.M., Pereira dos Santos Alves, J., Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry- A review, *Talanta* 194 (2019) 941-959.
- [253] Khoo, H., Review of bio-conversion pathways of lignocellulose to ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections, *Renew. and Sustain. Ener. Rev.* 46 (2015) 100–119.
- [254] Sriram, S., Seenivasan, R., Biophotonic perception on *Desmodesmus sp.* VIT growth, lipid and carbohydrate content, *Biores. Technol.* 198 (2015) 626–633.

## 7. Bibliografía

---

- [255] Keris-Sen, U.D., Gurol, M.D., Using ozone for microalgal cell disruption to improve enzymatic saccharification of cellular carbohydrates, *Biomass and Bioener.* 105 (2017) 59–65.
- [256] Herrera Adame, O.F., Lobo Baêta, B.R., Sousa Lima, D.R., Alves Gurgel, L.V., De Aquino, S.F., Methane and hydrogen production from anaerobic digestion of soluble fraction obtained by sugarcane bagasse ozonation, *Ind. Crops & Prod.* 109 (2017) 288–299.
- [257] Cheng, Y.L., Juang, Y.C., Liao, G.Y., Ho, S.H., Yeh, K.L., Chen, C.Y., Chang, J.S., Liu, J.C., Lee, D.J., Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*, *Biores. Technol.* 101 (2010) 9092-9096.
- [258] Halim, R., Rupasinghe, T., Tull, D., Webley, P., Mechanical cell disruption for lipid extraction from microalgal biomass, *Biores. Technol.* 140 (2013) 53–63.
- [259] Martin, G.J.O., Energy requirements for wet solvents extraction of lipids from microalgal biomass, *Biores. Technol.* 205 (2016) 40-47.
- [260] Onumaegbu, C., Alaswad, A., Rodriguez, C., Olabi, A., Modelling and optimization of wet microalgae *Scenedesmus quadricuada* lipid extraction using microwave pre-treatment method and response surface methodology. *Renew. Ener.* 205 (2019) 1323-1331.
- [261] UniProt, (n.d.). <https://www.uniprot.org/> (acceso septiembre 20, 2019).
- [262] Choi, S.M., Kwok, S.T., Ma, C.Y., 2009. Conformational study of SPI treated with ultrasound, Poster presentation. The 2009 Annual Meeting of the Institute of Food Technologists (IFT) and Food Expo, Anaheim, CA, 6-9 June 2009.
- [263] Jambrak, A.R., Mason, T.J., Lelas, V., Herceg, Z., Herceg, I.L., Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *J. Food Eng.* 86 (2008) 281-287.
- [264] Ashokkumar, M., Lee, J., Kentish, S., Grieser, F., Bubbles in an acoustic field: An Overview. *Ultrasonics Sonochem.* 14 (2004) 470-475.
- [265] Mahler, H.M, Friees, W., Grauschopf, U., Kiese, S., Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J. of Am. Pharm. Assoc.* 98 (2008) 2909-2934.
- [266] Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., Ashokkumar, M., Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonic Sonochem.* 18 (2011) 951-957.
- [267] Stathpulos, P.B., Scholz, G.A., Hwang, Y., Rumfeldt, J.A.O., Lepock, J.R., Meiering, E.M., Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci.* 13 (2004) 3017-3027
- [268] Gulserren, I., Guzey, D., Bruce, B.D., Weiss, J., Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemi.* 14 (2007) 173-183.
- [269] Davies, M.J., Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (2003) 761-770.
- [270] Cromwell, M.E., Hilario, E., Jacobson, F., Protein aggregation and bioprocessing. *The AAPS J.* 08 (2006) 572-579.
- [271] Kelly, F.J., Mudway, I.S., Protein oxidation at the air lung interface. *Amino Acids.* 25 (2003) 375-396.
- [272] Damodaran, S., K. L. Parkin, O. R. Fennema, *Fennema's Food Chemistry*, Fourth Edition, Taylor & Francis, (2007).
- [273] Mu, L., Zhao, M., Yang, B., Zhao, H., Cui, C., & Zhao, Q., Effect of ultrasonic treatment on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and on the physicochemical

## 7. Bibliografía

---

- properties of conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) (7) 4494-4499.
- [274] Tang, C. H., Wang, X. Y., Yang, X. Q., & Li, L. Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties. *Journal of Food Engineering*, 92 (2009) (4).
- [275] Jambrak, A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Krešić, G., Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Sci. Technol.* 43 (2010) 254-262.
- [276] Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E.C., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., Fan, G., Wang, L., Huang, X., Pan, S., Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocoll.* 30 (2013) 647-655.
- [277] Nygren-Babol, L., Karonen, N.L., The effect of different folate forms on denaturation of bovine folate binding protein. *Inter. Dairy J.* 19 (2009) 437-442.
- [278] Cataldo, F., On the action of ozone on proteins. *Polym. Degrad. and Stab.* 82 (2003) 105-114.
- [279] Uzun, H., Ibanoglu, E., Catal, H., Ibanoglu, S., Effects of ozone on functional properties of proteins. *Food Chem.* 134 (2012) 647-654.
- [280] Verbeeck, C.R.J., van der Berg, L.E., Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. *Macromol. Mater. Eng.* 295 (2010) 10-21.
- [281] Bier, J.M., Verbeeck, C.J.R., Lay, M.C., Thermal transitions and structural relaxation in protein-based thermoplastics. *Macromol. Mater. Eng.* 299 (2014) 524-539.
- [282] Malik, M.A., Sharma, H. K., Saini, C.S., High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: Effect on physicochemical and functional properties. *Ultrasonic Sonochem.* 39 (2017) 511-519.
- [283] Peressini, D., Peighambaroust, S.H., Hamer, R.J., Sensidoni, A., van der Goot, A.J., Effect of shear rate on microstructure and rheological properties of sheared wheat doughs. *J. Cereal Sci.* 48 (2008) 426-438.
- [284] Jerez, A., Partal, P., Martinez, I., Gallegos, C., Guerrero, A., Protein-based bioplastics: effect of thermo-mechanical processing. *Rheol. Acta* 46 (2007) 711-720.
- [285] Perez, V., Felix, M., Romero, A., Guerrero, A., Characterization of pea protein-based bioplastics processed by injection moulding. *Food Bioprodu. Process.* 97 (2016) 100-108.
- [286] Ferry, J.D., *Viscoelastic Properties of Polymers*. Wiley, 1980.
- [287] Félix, M., Romero, A., Martín-Alfonso, J.E., Guerrero, A., Development of crayfish protein-PCL biocomposite material processed by injection moulding. *Compos. Part B Eng.* 78 (2015) 291-297.
- [288] Félix, M., Lucio-Villegas, A., Romero, A., Guerrero, A., Development of rice protein biobased plastic materials processed by injection molding. *Ind. Crops Prod.* 79 (2016).
- [289] Martinez, A.W., Caves, J.M., Ravi, S., Li, W., Chaikof, E.L., Effects of crosslinking on the mechanical properties, drug release and cytocompatibility of protein polymers. *Acta Biomater.* 10 (2014) 26-33.
- [290] Sun, X.Z.S., Kim, H.R., Mo, X.Q., Plastic performance of soybean protein components. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (1999) 117-123.
- [291] Wallenberger, F.T., Weston, N., *Natural Fibers, Plastics and Composites*. Springer US, 2011.

---

## 7. Bibliografía

---

- [292] Husby, S., Holmskov-nielsen, U., Jensenius, J.C., Erb, K., Increased non-specific binding of heat-treated proteins to plastic surfaces analyzed by ELISA and HPLC Fractionation. *J. Immuno ass.* 6 (1985) 95–110.
- [293] Patrício, T., Bártolo, P., Thermal stability of PCL/PLA blends produced by physical blending process. *Procedia Eng.* 59 (2013) 292–297.
- [294] Felix, M., Martín-Alfonso, J.E., Romero, A., Guerrero, A., Development of albumen/ soy biobased plastic materials processed by injection molding. *J. Food Eng.* 125 (2014) 7–16.
- [295] Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F., Guerrero, A., Protein/glycerol blends and injection-molded bioplastic matrices: soybean versus egg albumen. *J. Appl. Polym. Sci.* 133 (2016).
- [296] Vivek, R., Joseph, K., Simon, G.P., Bhattacharyya, A.R., Melt-mixed composites of multi-walled carbon nanotubes and thermotropic liquid crystalline polymer: morphology, rheology and mechanical properties. *Compos. Sci. Technol.* 151 (2017) 184–192.
- [297] Song, Y., Xu, C., Zheng, Q., Styrene-butadiene-styrene copolymer compatibilized carbon black/polypropylene/polystyrene composites with tunable morphology, electrical conduction and rheological stabilities. *Soft Matter* 10 (2014) 2685-2692.
- [298] Chow, W.S., Mohd Ishak, Z.A., Karger-Kocsis, J., Morphological and rheological properties of polyamide 6/poly(propylene)/organoclay nanocomposites. *Macromol. Mater. Eng.* 290 (2005) 122–127.
- [299] Hoffmann, B., Kressler, J., Stöppelmann, G., Friedrich, C., Kim, G.-M., Rheology of nanocomposites based on layered silicates and polyamide-12. *Colloid Polym. Sci.* 278 (2000) 629–636.
- [300] Richter, S., Saphiannikova, M., Jehnichen, D., Bierdel, M., Heinrich, G., Experimental and theoretical studies of agglomeration effects in multi-walled carbon nanotube-polycarbonate melts. *Express Polym. Lett.* 3 (2009) 753–768.
- [301] Oksman, K., Skrifvars, M., Selin, J.-F., Natural fibres as reinforcement in polylactic acid (PLA) composites. *Compos. Sci. Technol.* 63 (2003) 1317–1324.
- [302] Felix, M., Martínez, I., Romero, A., Partal, P., Guerrero, A., Effect of pH and nanoclay content on the morphology and physicochemical properties of soy protein/montmorillonite nanocomposite obtained by extrusion. *Compos. B Eng.* 140 (2018) 197-203.
- [303] Nieuwland, M., Geerdink, P., Brier, P., Van Den Eijnden, P., Henket, J. T. M. M., Langelaan, M. L. P., Food-grade electrospinning of proteins. *Innovative Food*, (2013).
- [304] Colin-Orozco, J., Zapata-Torres, M., Rodríguez-Gattorno, G., & Pedroza-Islas, R. Properties of poly (ethylene oxide)/whey protein isolate nanofibers prepared by electrospinning. *Food Biophysics*, 10 (2014) (2) 134–144.
- [305] Stijnman, A. C., Bodnar, I., & Hans Tromp, R. Electrospinning of food-grade polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25 (2011) (5) 1393–1398
- [306] Kutzli, I., Gibis, M., Baier, S. K., & Weiss, J. Fabrication and characterization of food-grade fibers from mixtures of maltodextrin and whey protein isolate using needleless electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science*, (2018) 46328.
- [307] Son, W.K. Youk, J.H., Lee, T.S., Park, W.H., *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* 42 (2004) 5.
- [308] Seong O.H., Youk, J.H., Kyung, D.M., Kang, Y.O., Park, W. H., Electrospinning of cellulose acetate nanofibers using a mixed solvent of acetic acid/water: Effects of solvent composition on the fiber diameter, *Science Direct*, 62 (2008) 759-762.

## 7. Bibliografía

---

- [309] Chisolm, M.F., Dwan'isa, J.P.L., Thakur, S. Maryanoff, C.A., A practical method to determine polymer concentration in solution by density. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 14 (2009) (2) 126-139.
- [310] Martín-Alfonso, J.E., Cuadri, A.A., Greiner, A. The combined effect of formulation and pH on properties of polyethylene xide composite fiber containing egg albumen protein, *International Journal of Biological Macromolecules*, 112 (2018) 996-1004.
- [311] Deitzel J.M, Kosik W, McKnight S.H, Ten N.C.B, Desimone J.M, Crette S. Electrospinning of polymer nanofibers with specific surface chemistry. *Polymer* 43 (2002) 1025–9.
- [312] Doshi J, Reneker D.H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrost* 35 (1995) 151–6.
- [313] Hayati I, Bailey AI, Tadros TF. Investigations into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids. 1. Effect of electric-field and the environment on drops and factors affecting the formation of stable jets and atomization. *J Colloid Interface Sci.* 117 (1987) 205–21.
- [314] Sukigara S, Gandhi M, Ayutsede J, Micklus M, Ko F. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning—part 1:processing parameters and geometric properties. *Polymer* 44 (2003) 5721–7.
- [315] Duque, L.M., Rodríguez, L., López, M., Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14 (2013) 10-27.
- [316] Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., Sheng, J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*, 41 (2005) 423-432.
- [317] Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Lim T.C, Ma Z., An Introduction to Electrospinning and Nanofibers", *National University of Singapore*, 2005.
- [318] Sill T.J., Von Recum H.A., Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering," *Biomaterials*, 29 (2008) 1989.
- [319] Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D., Beck Tan N.C., The Effect of Processing Variables on the Morphology of Electrospun Nanofibers and Textiles, *Polymer*, 42 (2001) 261.
- [320] P. Sui, F. Nishimura, H. Nagare, T. Hidaka, Y. Nakagawa, H. Tsuno, Behavior of inorganic elements during sludge ozonation and their effects on sludge solubilisation, *Water Res.* 45 (2011) 2029-2037.
- [321] Cosgun, S. Semerci, N., Combined and individual application of ozonation and microwave treatment for waste activated sludge solubilization and nutrient release, *J. of Env. Man.* 241 (2019) 76-85
- [322] Herrera Adame, O.F., Lobo Baêta, B.R., Sousa Lima, D.R., Alves Gurgel, L.V., De Aquino S.F., Methane and hydrogen production from anaerobic digestion of soluble fraction obtained by sugarcane bagasse ozonation, *Ind. Crops & Prod.* 109 (2017) 288–299.
- [323] Zabed, H.M. Akter, S. Yun, J. Zhang, G. Awad, F.N. Qi, X. Sahu, J.N., Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production *Renew. Sustain. Energ. Rev.* 105 (2019) 105-128.
- [324] Travaini, R. Martín-Juárez, J. Lorenzo-Hernando, A. Bolado-Rodríguez, S., Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Biores. Technol.* 199, (2016) 2-12
- [325] Brown, N. Shilton, A., Luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilisation ponds: current undersating and future direction *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 13 (2014) 321-328.

## 7. Bibliografia

---

- [326] Huang, R., Tang, Y., Speciation dynamics of phosphorus during (hydro) thermal treatments of sewage sludge, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 14466-14474.
- [327] Solovchenko, A. Khozin-Goldberg, I. Selyakh, I. Semenova, L. Ismagulova, T. Luckyanov, A. Mamedov, I. Vinogradova, E. Karpova, O. Konyukhov, I. Vasilieva, S. Mojzes, P. Dijkema, C. Vecherskaya, M. Zvyagin, I. Nedbal, L. Gorelova, O. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. *Algal Research.* 43 (2019) 101651.
- [328] Egle, L. Rechberger, H. Krampe, J. Zessner, M., Phosphorus recovery from municipal wastewater: An integrated comparative technological, environmental and economic assessment of P recovery technologies. *Science of the Total Environment* 571 (2016) 522-542
- [329] Deng, Y. Zhang, T. Sharma, B. Nie, H., Optimization and mechanism studies on cell disruption and phosphorus recovery from microalgae with magnesium modified hydrochar in assisted hydrothermal system. 646 (2019) 1140-1154.
- [330] Farias Silva, C.E. Meneghello, D. Bertucco, A. A systematic study regarding hydrolysis and ethanol fermentation from microalgal biomass. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14 (2018) 172-182.
- [331] Sivaramakrishnan, R. Incharoensakdi, A. Utilization of microalgae feedstock concomitant production of bioethanol and biodiesel, *Fuel*, 217 (2018) 458-466.
- [332] Schultz-Jensen, N., Thygesen, A., Leipold, F., Thomsen, S.T., Roslander, C., Lilholt H., Bjerre, A.B., Pretreatment of the macroalgae *Chaetomorpha linum* for the production of bioethanol-Comparison of five pretreatment technologies. *Biores. Technol.* 140 (2013) 36-42.
- [333] Yin, G. Liao, P.H. Lo K.V. An ozone/hydrogen peroxide/microwave-enhanced advanced oxidation process for sewage sludge treatment. *Journal of Environmental Science and Health* 42 (2007) 1177-1181.
- [334] Chen, Y., Lin, H., Shen, N., Wang, Y., Wang, J., Wang, G., Phosphorus release and recovery from Fe-enhanced primary sedimentation sludge via alkaline fermentation, *Biores. Technol.* 278 (2019) 266-271.
- [335] Keris-Sen, U.D. Sen, U., Gurol, M.D., Combined effect of ozone and ultrasound on disruption of microalgal cells, *Separation Sci. and Technol.* 54 (2018) 1853-1861.