



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO MEXICANO PARA LA
PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA



TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA

PRESENTA

ABURTO BARRERA REGINA

“Optimización del proceso de cosecha de biomasa microalgal con quitosano y evaluación de la transesterificación para la producción de biodiésel”

Directores de tesis:

Dr. Raúl Hernández Altamirano

Dra. Jessica Karina Suastes Rivas

México, CDMX. enero de 2026



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-13
REP-2017

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, a de del

El Colegio de Profesores de Posgrado del en su Sesión
(Unidad Académica)

No. celebrada el día del mes de el conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Aburto	Apellido Materno:	Barrera	Nombre (s):	Regina
-------------------	--------	-------------------	---------	-------------	--------

Número de registro:

del Programa Académico de Posgrado:

Referente al registro de su tema de tesis, acordando lo siguiente

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

"Optimización del proceso de cosecha de biomasa microalgal con quitosano y evaluación de la transesterificación para la producción de biodiésel"

Objetivo general del trabajo de tesis:

Establecer las mejores condiciones de coagulación-floculación con quitosano para la cosecha de *Haematococcus pluvialis* y analizar su efecto en la recuperación de lípidos y la obtención de biodiésel.

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores

Director: 2° Directora:

No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

Centro Mexicano para la Producción más Limpia

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente

Director(a) de Tesis

Dr. Raúl Hernández Altamirano

2° Directora de Tesis (en curso)

Dra. Jessica Karina Suastes Rivas

Aspirante

Regina Aburto Barrera

Presidente del Colegio

Dr. Raúl Hernández Altamirano



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de siendo las horas del día del mes de del se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores del Posgrado del para examinar la tesis titulada:

"Optimización del proceso de cosecha de biomasa microalgal con quitosano y evaluación de la transesterificación para la producción de biodiésel"

Apellido Paterno:	Aburto	Apellido Materno:	Barrera	Nombre (s):	Regina
-------------------	--------	-------------------	---------	-------------	--------

Número de registro:

Alumna del Programa Académico de Posgrado:

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 1 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI NO **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:

El trabajo se realizó en tiempo y forma.

"Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.


Finalmente, y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

La tesis cumple con los requerimientos señalados por las condiciones vigentes

COMISIÓN REVISORA DE TESIS


Dr. Raúl Hernández Altamirano
Director de Tesis


Dra. Jessica Karina Suastes Rivas
2ª Directora de Tesis


Dr. Fabián Salvador Mederos Nieto


Dra. Violeta Yasmín Mena Cervantes


Dra. Dulce María Arias Lizárraga


PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
Dr. Raúl Hernández Altamirano



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN

En la Ciudad de México el día 14 del mes de enero del año 2026, la que suscribe Regina Aburto Barrera alumna del programa Maestría en Ingeniería en Producción más Limpia con número de registro A240692, adscrita a Centro Mexicano para la producción más Limpia manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Raúl Hernández Altamirano y de la Dra. Jessica Karina Suastes Rivas y cede los derechos del trabajo intítulado "Optimización del proceso de cosecha de biomasa microalgal con quitosano y evaluación de la transesterificación para la producción de biodiésel", al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expresado del autor y/o directores. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo raburtob1300@alumno.ipn.mx, rahernandez@ipn.mx y jeskaksr@hotmail.com. Si el permiso se otorga, al usuario deberá dar agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

Regina Aburto Barrera

DEDICATORIA

A mis padres Gabriela Barrera y Benjamín Aburto, por ser mi motor todos los días, mi inspiración y mi sostén durante mi trayectoria académica. Gracias por enseñarme que no existen límites cuando haces lo que amas, sin ustedes nada sería posible.

A mi hermano José María Aburto y mi hermana Sara Aburto, por ser mis compañeros de vida que nunca me dejan sola, gracias por seguir de cerca mis logros y mis momentos más vulnerables, por abrazarme (solo cuando quieren) y por dejarme ser.

A mi hermano Benjamín Tovar, por tu fortaleza que me enseña lo hermosa que es la vida, te la dedico para que cada palabra escrita aquí sea un paso, un abrazo y una sonrisa tuya.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis el Dr. Raúl Hernández Altamirano y la Dra. Jessica Karina Suastes Rivas por su guía, paciencia y acompañamiento durante todo este proceso. Sus conocimientos y apoyo constante fueron indispensables para la realización de esta investigación.

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y al Centro Mexicano para la Producción más Limpia (CMP+L) por permitirme formarme en la institución y poder desarrollarme académicamente. Al Laboratorio Nacional de Desarrollo y Aseguramiento de la Calidad de Biocombustibles (LaNDACBio) por brindarme los recursos necesarios y equipos para poder realizar la presente investigación.

A mis profesores gracias por compartir su experiencia, por su disposición para resolver dudas y por facilitarme las herramientas necesarias para el desarrollo experimental de esta investigación, a la Dra. Violeta Mena, Dr. Fabian Salvador Mederos, al Dr. Ignacio Elizalde y al Dr. Gabriel Pineda.

Al Ing. Luis Roberto Martínez por su apoyo incondicional, paciencia y conocimientos compartidos durante el desarrollo experimental.

A mis compañeras y compañeros de generación por su compañía en estos dos años, sus ideas, grupos de estudio, sesiones individuales y aprendizajes compartidos. Lo importante es el camino no la meta, y con ustedes el camino se volvió mas ligero, a Clarita, Fer, Gil, Xoch y Diego.

A mi familia, por su amor incondicional, por creer en mí incluso en los momentos más complicados y por brindarme la fortaleza que necesité en la enfermedad para continuar. Su apoyo ha sido la base de cada logro en mi vida.

CONTENIDO

Índice de Tablas	9
Índice de Figuras	10
Resumen.....	11
Abstract	12
Capítulo 1.	13
1.1. Introducción	13
1.2. Justificación	14
1.3. Hipótesis.....	14
1.4. Objetivos.....	15
Capítulo 2. Marco teórico.....	16
2.1. Biocombustibles y biomasa	16
2.2. Microalgas (MA)	18
2.3. Cosecha de microalgas	23
2.3.1. Centrifugación	24
2.3.2. Sedimentación.....	24
2.3.3. Filtración	25
2.3.4. Coagulación-Floculación.....	25
2.3.5. Biocoagulación	26
2.4. Quitosano.....	28
2.5. Producción de biodiésel a partir de microalgas	31
2.6. Transesterificación	32
2.7. Estado del arte.....	35
Capítulo 3. Metodología.....	45
3.1. Etapa 1. Cultivo y cinética de crecimiento de microalgas	46
3.1.1. Condiciones de cultivo.....	47
3.1.2. Cinéticas de crecimiento	49
Peso seco	49
Concentración celular	50
Densidad óptica	51

3.2.	Etapa 2. Cosecha de M.A.	52
3.3.	Etapa 3. Extracción de lípidos y transesterificación convencional.	54
Capítulo 4. Resultados y análisis.....		60
4.1.	Etapa 1. Cinéticas de crecimiento	60
4.1.	Etapa 2. Cosecha de M.A.	63
4.2.1.	Diseño experimental Box-Behnken y prueba de jarras	63
4.3.	Etapa 3. Extracción de lípidos y transesterificación	73
4.3.1.	Escalamiento de coagulación.....	73
4.3.2.	Cálculo de huellas de carbono	74
4.3.3.	Extracción lipídica	74
4.3.4.	Transesterificación	84
4.3.5.	Cromatografía de gases	88
Conclusiones		91
Referencias.....		93
Anexo 1.		101

Índice de Tablas

TABLA 1. COMPARACIÓN DE ALGUNAS FUENTES DE BIODIÉSEL (ADAPTADO DE CHISTI, 2007).	20
TABLA 2. PRODUCTIVIDADES Y CONTENIDO DE LÍPIDOS EN ESPECIES DE MICROALGAS (ADAPTADO DE: DAMIANI ET AL., 2010; KARPAGAM ET AL., 2015; MATA ET AL., 2010).	21
TABLA 3. BIOCOAGULANTES UTILIZADOS EN LA COSECHA DE MICROALGAS.	27
TABLA 4. CONDICIONES DE FLOCULACIÓN DE DISTINTAS ESPECIES DE MICROALGAS CON QUITOSANO	38
TABLA 5. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS BAJO DISTINTAS TÉCNICAS	40
TABLA 6. TIPOS DE CATÁLISIS Y EFICIENCIAS DE FAMES CON DISTINTAS MICROALGAS	42
TABLA 7 . MEDIO DE CULTIVO BBM.	47
TABLA 8. CINÉTICAS REALIZADAS.	48
TABLA 9. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA PRUEBA DE JARRAS.	52
TABLA 10. RESUMEN DE ABREVIATURAS DE LAS DISTINTAS MUESTRAS.	59
TABLA 11. TASAS DE CRECIMIENTO ESPECÍFICAS	61
TABLA 12. RESULTADOS DE PESO SECO, DENSIDAD ÓPTICA Y DENSIDAD CELULAR.	61
TABLA 13. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRUEBA DE JARRAS	63
TABLA 14. ESTADÍSTICAS DE AJUSTE PARA MODELO CUADRÁTICO	65
TABLA 15. ANOVA PARA EL MODELO CUADRÁTICO	65
TABLA 16. RESULTADOS DEL ESCALAMIENTO DE COAGULACIÓN.	73
TABLA 17. RESULTADOS DE HUELLAS DE CARBONO	74
TABLA 18. RESULTADOS EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS	74
TABLA 19. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES EN LÍPIDOS.	78
TABLA 20. ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS MUESTRAS DE LÍPIDOS Y BIOMASA INICIAL	83
TABLA 21. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES EN LÍPIDOS Y QUITOSANO.	86
TABLA 22. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE MUESTRAS F_4 Y F_CC.	89
TABLA 23. GWP DE INSUMOS Y ENERGÍA	101
TABLA 24. CÁLCULOS DE LOS kWh DE CADA UNO DE LOS EQUIPOS	101
TABLA 25. CÁLCULOS PARA OBTENER LA HUELLA DE CARBONO PARA EL PROCESO CON COAGULACIÓN CON QUITOSANO	101

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MATRIZ ENERGÉTICA MUNDIAL (ADAPTADO DE: SECRETARIA DE ENERGÍA, 2022).	16
FIGURA 2. MATRIZ ENERGÉTICA EN MÉXICO (ADAPTADO DE: SECRETARIA DE ENERGÍA, 2022).	17
FIGURA 3. REACTOR DE TIPO ABIERTO (RACEWAY).	22
FIGURA 4. FOTOBIOREACTOR TUBULAR VERTICAL.....	23
FIGURA 5. REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN (ADAPTADO DE: HALIM ET AL., 2012).....	32
FIGURA 6. ETAPAS DE METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.	45
FIGURA 7. ETAPA 1 DE LA METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.	46
FIGURA 8. REACTORES DE 150 ML Y 1 L.....	48
FIGURA 9. ETAPAS DE CRECIMIENTO DEL INÓCULO.	49
FIGURA 10. ESQUEMA DE LA CÁMARA DE NEUBAUER.	50
FIGURA 11. ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS THERMO SCIENTIFIC™ BIOMATE™ 160.....	51
FIGURA 12. DISEÑO DE EXPERIMENTOS ETAPA DE COSECHA.	52
FIGURA 13. EQUIPO PHIPPS & BIRD PARA PRUEBA DE JARRAS.	54
FIGURA 14. DISEÑO DE EXPERIMENTOS ETAPA DE ESCALAMIENTO DE COAGULACIÓN.	55
FIGURA 15. LÍMITES DEL SISTEMA PARA EL CÁLCULO DE HUELLA DE CARBONO.....	55
FIGURA 16. DISEÑO DE EXPERIMENTOS ETAPA DE EXTRACCIÓN LIPÍDICA Y TRANSESTERIFICACIÓN CONVENCIONAL.	56
FIGURA 17. SISTEMA DE REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN	57
FIGURA 18. PESO SECO VS TIEMPO DE CINÉTICA DE C.1, C.3 Y C.8.....	60
FIGURA 19. CINÉTICAS DE LA DENSIDAD CELULAR (CEL · ML ⁻¹) PARA C.1, C.3 Y C.8.....	60
FIGURA 20. CINÉTICA DE DENSIDAD ÓPTICA PARA C.1, C.3 Y C.8.	61
FIGURA 21. GRAFICAS DE CONTORNO DE FE A LOS 30 MIN. B VS A, CONSTANTE C=20.....	67
FIGURA 22. GRAFICAS DE CONTORNO DE FE A LOS 30 MIN. C VS A, CONSTANTE B=4.	68
FIGURA 23. GRAFICAS DE CONTORNO DE FE A LOS 30 MIN. C VS A, CONSTANTE B=10.....	70
FIGURA 24. GRAFICAS DE CONTORNO DE FE A LOS 30 MIN. C VS B, CONSTANTE A=15.....	71
FIGURA 25. ESPECTROS DE FT-IR DE LÍPIDOS EXTRAÍDOS.....	77
FIGURA 26. ESPECTROS DE FT-IR DE LÍPIDOS L_10 Y QUITOSANO	79
FIGURA 27. TG ´S Y DTG ´S DE LAS MUESTRAS DE LÍPIDOS.....	82
FIGURA 28. TG Y DTG DE LA BIOMASA INICIAL	82
FIGURA 29. ESPECTROS DE INFRARROJO CORRESPONDIENTES A LOS FAMES	86

RESUMEN

El interés por las microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles ha aumentado en los últimos 10-12 años debido a su alta productividad lipídica y a su potencial para reducir impactos ambientales frente a los combustibles fósiles. No obstante, la viabilidad de estos procesos está condicionada por etapas críticas como la cosecha de biomasa por la alta tasa de energía invertida en esta etapa. En este contexto, la presente tesis tuvo como objetivo evaluar el uso de quitosano como coagulante para la cosecha de *Haematococcus pluvialis* y su efecto sobre la calidad de los lípidos y FAMES obtenidos en las etapas posteriores.

La microalga *H. pluvialis* fue cultivada por 30 días en un reactor de tipo raceway de 30 L durante este tiempo se realizaron cinéticas de crecimiento y se obtuvieron en total 8 batches. La cosecha de biomasa se llevó a cabo mediante pruebas de jarras empleando quitosano, grado reactivo, como coagulante, optimizando variables operativas, pH, velocidad de agitación y concentración de quitosano, mediante un diseño experimental Box-Behnken.

El análisis de FAME reveló las diferencias entre la muestra cosechada a pH 4 con quitosano y la centrifugada, confirmando que el método de cosecha influye directamente en la calidad del perfil lipídico obtenido.

Adicionalmente, se estimó la huella de carbono de la etapa de cosecha con quitosano y con centrifugación, considerando los insumos energéticos y materiales asociados. Los resultados mostraron que, la coagulación con quitosano ($35.73 \text{ kg CO}_2\text{-eq kg}^{-1}$ biomasa seca) no representa una contribución significativa a las emisiones de CO_2 equivalente comparado con la cosecha con centrifugación ($1,716.16 \text{ kg CO}_2\text{-eq kg}^{-1}$ biomasa seca).

Posteriormente, la biomasa recuperada fue sometida a un proceso estático con solventes para la extracción de lípidos y a una reacción de transesterificación básica para la obtención de FAMES. Los productos obtenidos fueron caracterizados mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), lo que permitió identificar las principales bandas funcionales asociadas a lípidos y ésteres metílicos, así como identificar la influencia de las condiciones de coagulación sobre la composición química del material extraído. Los resultados mostraron que el uso de quitosano permitió eficiencias mayores de recuperación de 99.72 % (pH 4) y 98.88 % (pH 10) comparadas con la centrifugación (91.85 %)

ABSTRACT

Interest in microalgae as a feedstock for biofuel production has increased over the past 10–12 years due to their high lipid productivity and potential to reduce the environmental impacts associated with fossil fuels. However, the viability of these processes is constrained by critical stages such as biomass harvesting, which involves a high energy demand. In this context, the aim of the present thesis was to evaluate the use of chitosan as a coagulant for harvesting *Haematococcus pluvialis* and its effect on the quality of the lipids and FAMES obtained in subsequent processing stages.

H. pluvialis was cultivated for 30 days in a 30 L raceway-type reactor, during which growth kinetics were monitored and a total of eight batches were produced. Biomass harvesting was carried out through jar tests using reagent-grade chitosan as a coagulant, optimizing operational variables—pH, mixing speed, and chitosan concentration—through a Box–Behnken experimental design.

The FAME analysis revealed clear differences between the sample harvested at pH 4 with chitosan and the centrifuged sample, confirming that the harvesting method directly influences the quality of the resulting lipid profile.

Additionally, the carbon footprint of the harvesting stage using chitosan and centrifugation was estimated, considering associated energy and material inputs. The results showed that chitosan coagulation (35.73 kg CO₂-eq kg⁻¹ dry biomass) does not represent a significant contribution to CO₂-equivalent emissions compared to centrifugation (1,716.16 kg CO₂-eq kg⁻¹ dry biomass).

Subsequently, the recovered biomass was subjected to a static solvent extraction process for lipid recovery and a basic transesterification reaction for FAME production. The products obtained were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), which allowed identification of the main functional bands associated with lipids and methyl esters, as well as the influence of coagulation conditions on the chemical composition of the extracted material. The results showed that the use of chitosan enabled high biomass recovery efficiencies of 99.72% (pH 4) and 98.88% (pH 10), compared with centrifugation (91.85 %), achieving high recovery yields without negatively affecting lipid extraction or FAME formation when harvesting at pH 4.

Capítulo 1.

1.1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático, debido a los gases de efecto invernadero (GEI), ha elevado la temperatura global 1.2 °C frente a la era preindustrial (IPCC, 2018). Si la tendencia continúa, se estima que entre 2030 y 2052 se alcanzará un incremento de 1.5 °C (IPCC, 2022). Ante este escenario, iniciativas internacionales como el Acuerdo de París (COP21) han establecido compromisos para limitar dicho incremento y acelerar la transición hacia sistemas energéticos más sostenibles.

En la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo (CNUMAD, Río de Janeiro, 1992) se adoptó la Agenda 21, firmada por más de 178 países, en la que se resalta la necesidad de promover tecnologías energéticas ecológicamente racionales, incluyendo fuentes renovables. De manera complementaria, la Agencia Internacional de Energía (IEA) ha planteado estrategias para alcanzar emisiones netas cero, basadas en la descarbonización del sector energético mediante combustibles limpios, electrificación y captura de CO₂ (United Nations Conference on Environment & Development, 1992).

Dentro de este marco global, los biocombustibles se han consolidado como alternativas viables para reducir las emisiones particularmente en el sector transporte, siendo ya producidos a escala industrial. En este contexto, la biomasa microalgal ha emergido como una de las fuentes más prometedoras para la producción de biodiésel debido a su alta productividad lipídica, su capacidad de capturar CO₂, su cultivo en aguas residuales o no aptas para la agricultura, y su independencia de suelos fértiles. A diferencia de otros cultivos energéticos, las microalgas pueden generar rendimientos de aceite superiores en uno o dos órdenes de magnitud, lo que las posiciona como un insumo estratégico para biorefinerías de nueva generación.

No obstante, la producción de biodiésel a partir de microalgas enfrenta retos significativos. De manera particular, la cosecha de biomasa representa uno de los cuellos de botella más importantes desde los puntos de vista técnico, económico y ambiental, ya que puede requerir

entre el 20 % y 40 % del costo total del proceso, así como un alto consumo energético (Uduman et al., 2010). Además, la eficiencia y el método de cosecha influyen directamente en la calidad de los lípidos recuperados y en el desempeño de las etapas subsecuentes, como la extracción y la transesterificación.

Por lo anterior, resulta indispensable evaluar alternativas que permitan reducir los costos y el impacto ambiental de la cosecha, sin comprometer la calidad del aceite. En este marco, la presente tesis analiza el uso de quitosano como coagulante para la recuperación de *Haematococcus pluvialis*, así como su efecto sobre la calidad de los lípidos y los FAME obtenidos, con el fin de aportar información relevante para el escalamiento sostenible de la producción de biodiésel microalgal.

1.2. Justificación

En las últimas décadas se han realizado esfuerzos por ampliar los energéticos por opciones limpias que contribuyan al medio ambiente y que pueda satisfacer la demanda actual de energía. Se han estudiado alternativas para reducir la energía invertida en la cosecha de microalgas, que representa hasta el 20% de la energía, para su posterior transformación en biodiésel y se han encontrado métodos como la floculación química (Kim *et al.*, 2022). Esta misma no se ha estudiado lo suficiente con biofloculantes como lo es el quitosano, el efecto que este tiene en la transesterificación y la cosecha de biomasa con el mismo. Así mismo, no se conoce el mecanismo de acción de la cosecha con quitosano en el incremento de otros metabolitos de interés, como son los lípidos.

Por lo mencionado anteriormente, se propone realizar la etapa de cosecha de microalgas con quitosano para su posterior extracción lipídica y transesterificación.

1.3. HIPÓTESIS

Es posible realizar la cosecha de microalgas por medio del proceso de coagulación-floculación con quitosano y obtener mayor cantidad de biomasa, lípidos y una mayor producción de biodiésel vía transesterificación convencional, comparada a la cosecha convencional con centrifugación.

1.4. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Establecer las mejores condiciones de coagulación-floculación con quitosano para la cosecha de *Haematococcus pluvialis* y analizar su efecto en la recuperación de lípidos y la obtención de biodiesel.

Objetivos específicos:

- Caracterizar el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo raceway
- Determinar las mejores condiciones de coagulación-floculación con quitosano, mediante pruebas de jarras, con base en un diseño experimental tipo Box-Behnken por el método de superficies de respuesta (MSR).
- Analizar el impacto del método de cosecha con quitosano en el porcentaje de recuperación de lípidos y obtención de biodiésel.
- Comparar la eficiencia en la recuperación de biomasa, de lípidos y producción de biodiésel entre biomasa cosechada con quitosano y por centrifugación.
- Analizar la composición de ácidos grasos del biodiésel (FAMES) mediante cromatografía de gases.

Capítulo 2. Marco teórico

2.1. BIOCOMBUSTIBLES Y BIOMASA

Las energías renovables en el mundo y en México representan el 15%, mientras que los hidrocarburos en el mundo el 68% y en México el 80.71%. Del total de la energía primaria producida, el 55.07% se destina al sector transporte seguido del 22.79% para el sector industrial (Secretaría de Energía, 2022). Por tal motivo, el sector de transporte al representar el porcentaje más alto de consumo del petróleo se vuelve prioritario desarrollar nuevas formas de energía más limpias dirigidas a este sector.

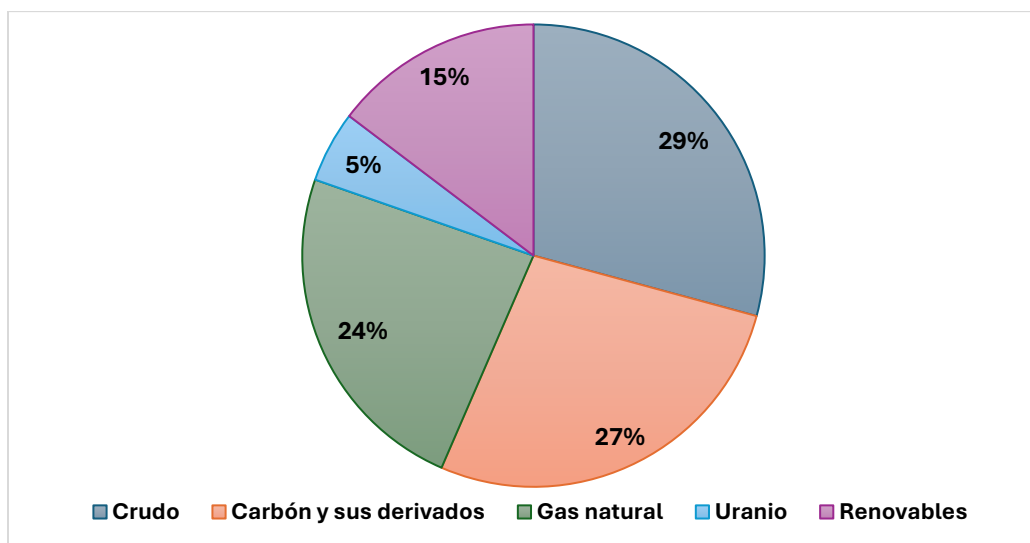


Figura 1. Matriz energética mundial (Adaptado de: Secretaría de Energía, 2022).

Dentro de los renovables encontramos a los biocombustibles, que son las energías que pueden ser sustituidas en el sector transporte por las tecnologías usadas. Se sabe que el sector transporte contribuye a más de un tercio de las emisiones de CO₂ (International Energy Agency, 2018).

Los biocombustibles representaban para el 2020 el 1% y se plantea aumente a un 20% para el 2050, mientras que los biocombustibles cubrirán el 14% de la demanda mundial de energía para el transporte en 2050, en comparación a lo aportado en el 2020 (4%) (The International Energy Agency, 2021). Además, tienen la ventaja de emitir hasta 78% menos de dióxido de

carbón al ser quemado, 98% menos de azufre y 50% menos de partículas (Brown & Zeiler, 1993).

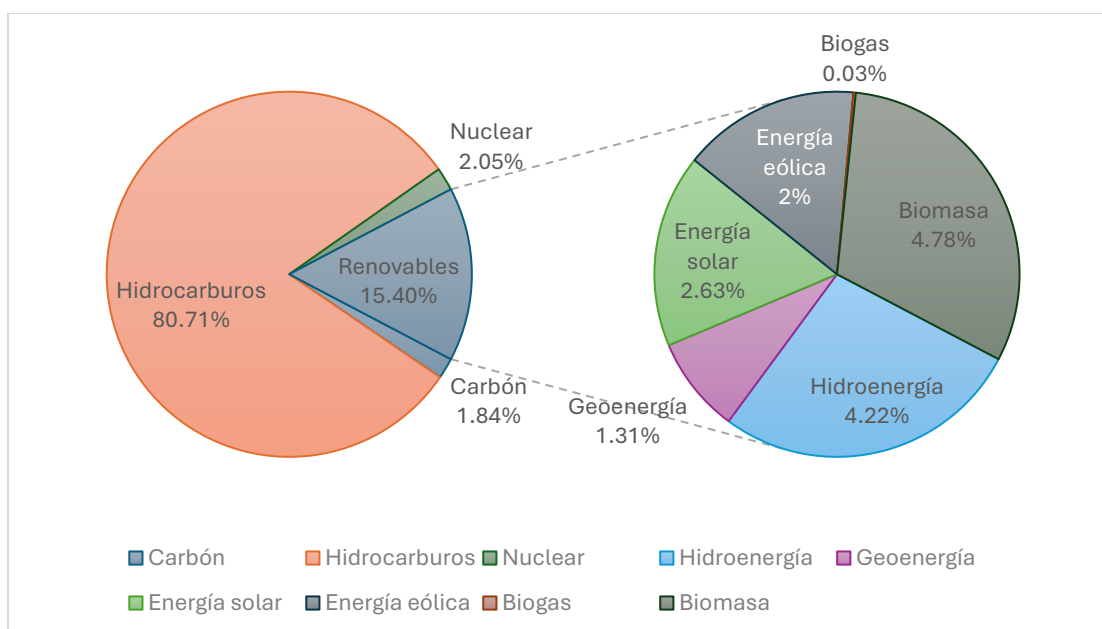


Figura 2. Matriz energética en México (Adaptado de: Secretaría de Energía, 2022).

Una de las clasificaciones de los biocombustibles es conforme a su generación:

- Primera generación: Se producen a partir de materia prima de fuentes alimenticias.
- Segunda generación: Provenientes de biomasa lignocelulósicas y desperdicios agrícolas.
- Tercera generación: Provenientes de enzimas, algas u organismos.

Los de primera generación tienen como materia prima almidón y cultivos de azúcar, y semillas oleaginosas (Ho et al., 2014). Arroz, trigo, maíz, caña de azúcar, palma de aceite, soja y cebada son algunas de estas materias primas (Ho et al., 2014; Patel & Kumar, 2016; Vassilev & Vassileva, 2016).

Se ha llegado a cuestionar este tipo de materias primas por su presunta competitividad con los alimentos. Por ello se desarrollaron los de segunda generación (Montingelli et al., 2015). Los de segunda generación son producidos a partir de residuos y biomasa lignocelulósica. Tiene la ventaja de que son productos no comestibles, requieren poca tierra de cultivo y

ofrecen mayores rendimientos (Montingelli et al., 2015; Vassilev & Vassileva, 2016). Presentan la desventaja de no ser económicamente viables a gran escala (Naik et al., 2010; Nigam & Singh, 2011).

Los de tercera generación se producen a partir de microorganismos, algas, levaduras y bacterias, es uno de los recursos más prometedores (Raslavičius et al., 2014; Saber et al., 2016). Pueden usarse a gran escala y sosteniblemente (Sirajunnisa & Surendhiran, 2016). Su tasa de producción es mucho mayor que la de otras materias primas debido al crecimiento acelerado (Saber et al., 2016). Además de que crecen en tierras no cultivables y se pueden escalar, los costos de producción y eficiencia son altos y bajos respectivamente. A pesar de los aspectos positivos mencionados, las algas no se han producido a escala comercial en México (Ziolkowska & Simon, 2014).

Las materias primas de biomasa son ampliamente consideradas como una fuente importante de energía renovable, reduce significativamente la dependencia de los combustibles fósiles tradicionales, especialmente en el caso de países que pueden obtener biomasa de diversas fuentes.

Los que más se producen actualmente son los de primera y segunda generación. El biodiésel, bioetanol y el biohidrógeno son algunos de los biocombustibles que se han venido desarrollando con más fuerza el total producido de etanol y biodiésel ronda los 150 billones de litro por año lo cual satisface el 4% de la demanda del transporte en el mundo (International Energy Agency, 2018).

Este mercado dirigido al transporte también se puede satisfacer por medio de biocombustibles a partir de microalgas. Tiene características que le brindan ventajas como la tasa rápida de crecimiento, alta eficiencia de fotosíntesis y alto contenido de lípidos en algunas especies (L. Peng et al., 2020a).

2.2. MICROALGAS (MA)

Las algas son consideradas como un grupo muy extenso de organismos acuáticos fotosintéticos que representan 50% de organismos fotosintéticos de la tierra (Moroney &

Ynalvez, 2009). El proceso de fotosíntesis en las algas permite la fijación dióxido de carbono y estudios afirman que la fijación es en uno o dos órdenes de magnitud mayor que las plantas terrestres (B. Wang et al., 2008).

Las algas contienen metabolitos o biocompuestos de interés como proteínas, lípidos y carbohidratos, y ciertos tipos de pigmentos como carotenoides, biopolímeros, drogas, biofertilizantes, entre otros (Pandey Ashok, Duu-Jong Lee, 2014). Estos compuestos pueden convertirse en productos deseados, como es el caso de los lípidos que por un proceso de transesterificación se convierten en biodiésel (Pandey et al., 2024).

Las microalgas son un grupo de organismos procariontes ancestrales, se les conocen principalmente por su característica fototrófica pero existen cuatro variaciones generales. Los metabolismos que presentan son: autótrofos, heterótrofos, mixotróficos y fotoheterotróficos. Son capaces de un cambio metabólico en respuesta a los cambios en condiciones ambientales (Katarzyna & Marquez-Rocha, 2004).

- Fotoautotróficamente, usan la luz artificial o natural como su fuente de energía única y está la convierten en energía química por medio de reacciones fotosintéticas.
- Heterótrofos, es decir, que solo utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía.
- Mixotróficamente, es decir, la fuente de energía la obtienen únicamente de la fotosíntesis, pero los compuestos orgánicos son esenciales como el CO₂. Existe un subtipo conocido como anfitrofia y significa que los organismos pueden vivir de forma autótrofa o heterótrofa, de acuerdo con la concentración de compuestos en el medio y la cantidad de incidencia lumínica.
- La fotoheterotrofica, también conocida como fotoorganitrofica, fotoasimilación, fotometabolismo, describe el metabolismo en el que se requiere la luz para usar compuestos orgánicos como fuente de carbono. Los metabolismos fotoheterotróficos y mixotróficos no están bien diferenciados, en particular, se pueden definir de acuerdo con una diferencia de la fuente de energía requerida para realizar el crecimiento y la producción específica de metabolitos.

El total de producción anual de biomasa microalgal es aproximadamente 12 millones de toneladas base seca (cerca de 16 millones de toneladas base húmeda) para macroalgas y cerca de 9,200 toneladas base seca de microalgas, que son cosechadas de hábitats silvestres y de granjas de acuicultura (H. Chen et al., 2015; Jung et al., 2013; Sambusiti et al., 2015).

Como se mencionó, las microalgas producen metabolitos de interés, entre los que destaca el contenido de lípidos que se reporta entre 20-70% en peso seco. Además, se destacan de entre los cultivos terrestres por su tasa de crecimiento, la tasa fotosintética, su capacidad para fijar el CO₂ (Mondal et al., 2023). Esta última da una ventaja importante, ya que considera a las microalgas como una materia prima con emisiones netas negativas de carbono (Mondal et al., 2023).

Chisti (2007) nos muestra en la siguiente tabla el potencial de las microalgas comparándolas con otros cultivos. Las microalgas tienen la ventaja de su crecimiento muy rápido y su alto contenido de aceite. La tasa de crecimiento puede ser duplicada hasta en 3.5 h (Chisti, 2007; Mondal et al., 2023).

Tabla 1. Comparación de algunas fuentes de biodiésel (Adaptado de Chisti, 2007).

Cultivo	Rendimiento de aceite (L/ha)	Área de tierra necesaria (M ha)^a	Porcentaje del área de cultivo existente en EE. UU.^a
Maíz	172	1540	846
Soya	446	594	326
Canola	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Aceite de palma	5950	45	24
Microalgas ^b	136,900	2	1.1
Microalgas ^c	58,700	4.5	2.5

a Para satisfacer el 50% de las necesidades de combustible para transporte de los Estados Unidos.

b 70% de aceite (en peso) en la biomasa.

c 30% de aceite (en peso) en la biomasa.

La eficiencia de conversión de la energía solar en energía química es más alta que los cultivos oleaginosos, es capaz de producir más aceite por unidad de área que cultivos como la soya y el maíz (Show & Lee, 2014).

La productividad de los cultivos energéticos en general varía dependiendo el cultivo y las condiciones de cultivo. Esta puede representar una ventaja debido a que se puede controlar las condiciones. Las microalgas pueden alcanzar hasta el 65% de rendimiento de biodiésel (Pandey et al., 2024). La palma de aceite genera aproximadamente 5,950 litros de aceite por hectárea por año, la canola produce cerca de 1,215 litros, y la soya alrededor de 450 litros por hectárea por año (Demirbas, 2009a). En cuanto a los cultivos utilizados principalmente para la producción de etanol, la caña de azúcar y el sorgo dulce pueden ofrecer rendimientos de 5,600 a 7,500 litros de etanol por hectárea por año, mientras que el maíz proporciona unos 3,700 litros por hectárea por año (Goldemberg, 2007).

Tabla 2. Productividades y contenido de lípidos en especies de microalgas (adaptado de: Damiani et al., 2010; Karpagam et al., 2015; Mata et al., 2010).

Especie de microalga	Contenido de lípidos (% peso base seca)	Productividad lipídica (mg L⁻¹ d⁻¹)
<i>Botryococcus sp</i>	25.0-75.0	-
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0-63.0	10.3-50.0
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.0	11.2-40.0
<i>Chlorella sp</i>	10.0-48.0	42.1
<i>Chlorococcum sp</i>	19.3	53.7
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0-55.0	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9-18.4	35.1
<i>Scenedesmus sp</i>	19.6-21.1	40.8-53.9
<i>Haematococcus pluviales</i>	15.61 ± 1.46	-
<i>Haematococcus pluviales</i>	34.85 ± 0.78	-
<i>Haematococcus pluviales</i>	32.99 ± 2.77	-
<i>Chlamydomonas Reinhardt</i>	23.8 ± 1.6	15.2 ± 0.42

1.3.1. Métodos de cultivo

La producción de biodiésel a partir de microalgas involucra distintas etapas comenzando con el cultivo de microalgas, seguida de la cosecha por métodos de separación sólido-líquido para obtener su biomasa, posteriormente se realiza el proceso de deshidratación, secado y por

último la extracción del aceite y su transesterificación. Estos pasos son los convencionales que dan paso al biodiesel.

En este apartado se mencionarán los métodos de cultivo convencionales y en que consiste cada uno de ellos. Existen dos tipos de cultivos de microalgas en general, sistemas estanques abiertos (Raceway/open pond) (figura 3) y sistemas cerrados llamados fotobiorreactores (FBR).

Los estanques abiertos comúnmente están formados por un estanque de canalización de forma ovalada que oscila los 0.3 m de profundidad. Con apoyo de una rueda de paletas se realiza la circulación y mezclado. Cuenta con baffles en el canal para permitir el flujo del agua. Se realiza la alimentación y el cultivo por delante y detrás de las paletas respectivamente. La operación de las paletas es continua para evitar la sedimentación de la biomasa (Chisti, 2007).

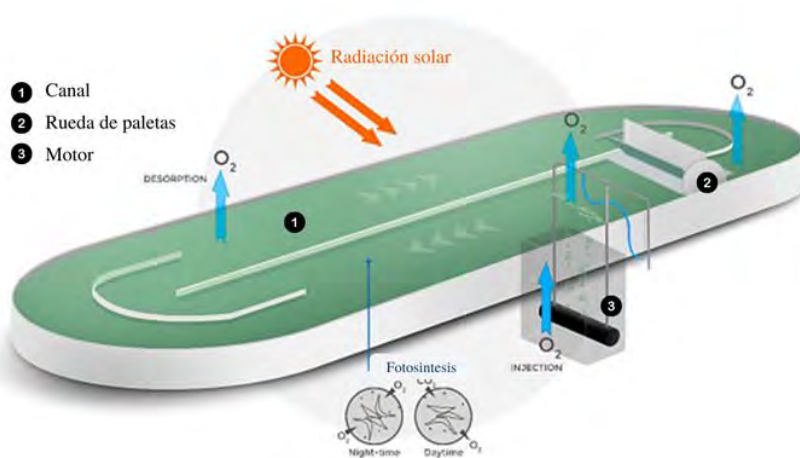


Figura 3. Reactor de tipo abierto (Raceway).

Los estanques abiertos son menos costosos que los fotobiorreactores, por el costo de construcción y operación. Así mismo, tienen menos productividad de biomasa (Chisti, 2007).

Los fotobiorreactores tubulares (figura 4) son un conjunto de tubos transparentes de material plástico o vidrio en los cuales se captura la luz solar. Los diámetros de los tubos deben ser pequeños para que la luz penetre, comúnmente de 0.1 m o menos. Dentro de esta configuración de cultivo y microalgas se recircula en el tubo hacia el colector solar y de

regreso, esta operación es continua por lo que se requiere una bomba operando. El piso comúnmente es pintado de blanco para incrementar la reflectancia o albedo. Existen distintos arreglos de los tubos como los helicoidales que estos son usados para volúmenes pequeños, verticales y horizontales y airlift (Chisti, 2007).



Figura 4. Fotobiorreactor tubular vertical.

Se debe de mantener un flujo turbulento. Este se logra gracias a bombas mecánicas o bombas de tipo airlift. Se requiere regular la concentración de oxígeno, la tasa de flujo y la concentración de biomasa (Chisti, 2007).

El costo de producción de biomasa microalgal en reactores abiertos va de USD \$0.73-2.71/kg de masa seca (Kang et al., 2015). Este tipo de cultivos permite la recuperación de biomasa con bajos costos, comparado con los fotobiorreactores.

En los dos tipos de sistemas se requiere la cosecha de las microalgas dado que la biomasa se encuentra en dilución con el medio de cultivo, en el siguiente apartado se estudia esta etapa más a profundidad.

2.3. COSECHA DE MICROALGAS

Se han estudiados algunos de los problemas con las distintas etapas de la producción de biodiesel, como cosecha, deshidratación, secado, extracción de lípidos, transesterificación y

purificación para obtener un alto rendimiento biodiésel de microalgas, lo que hace que este proceso no sea económicamente atractivo (J. Y. Kim et al., 2022; Yang et al., 2011).

Dado que los procesos de recolección y posterior deshidratación están en un uso intensivo de energía, que representa entre el 3 y el 15 % del costo total de producción de biodiésel, es crucial seleccionar el método de recolección apropiado para reducir el costo general del producto. Además, el método de recolección no debe afectar la calidad de las microalgas (por ejemplo, ruptura celular y pérdida de componentes celulares) para garantizar los máximos rendimientos de producción (J. Y. Kim et al., 2022).

La cosecha de biomasa microalgal puede realizarse por medio de centrifugación, filtración o en algunos casos por sedimentación. Esta técnica debe servir para altos volúmenes, por lo que la filtración sería lenta. Otra técnica usada es la floculación-flotación. La cantidad de humedad que se necesita también es un parámetro determinante para elegir un método, al finalizar este, se deberá secar la biomasa (Pandey Ashok, Duu-Jong Lee, 2014).

La cosecha depende de propiedades de la microalga, densidad celular, tamaño y especificaciones del producto final (Amaro et al., 2011).

2.3.1. CENTRIFUGACIÓN

El método de centrifugación se emplea para separar el medio en el que está suspendida la biomasa. Es el método comúnmente usado en el que se puede emplear volúmenes altos. (Molina Grima et al., 2003). La centrifugación consiste en aplicar una aceleración centrípeta para separar el medio de la biomasa. Se han reportado eficiencias de hasta el 100% a 13,000 xg. La única desventaja es la ruptura de algunas estructuras celulares y que para algunos usos no es beneficioso (Heasman et al., 2000).

2.3.2. SEDIMENTACIÓN

La sedimentación por gravedad es uno de los métodos más usados para la cosecha en plantas de tratamiento. Esto se da por los volúmenes tan grandes de manejo y por los costos de manejo. El factor que ayuda a que se acelere la velocidad de sedimentación es el tamaño de las células. Los tanques de sedimentación son estos equipos donde sucede. Este método no

es factible para algunas cepas que tienen tamaños y pesos de células pequeños y la sedimentación llega a ser de días.

Muchos estudios aprovechan y realizan la cosecha sedimentando y centrifugando la biomasa.

2.3.3. FILTRACIÓN

La filtración consiste en forzar el paso de la suspensión de algas por un filtro usando una bomba de vacío. Esta técnica tiene como ventaja que se puede cosechar un alga por más dispersa que se encuentre en el medio. Los principales obstáculos son el ensuciamiento del filtro la retención dentro del lecho filtrante y la intermitencia de este método.

Dentro de esta categoría existen la filtración por vacío, filtración por presión, ultrafiltración, filtración magnética, entre otras (Ghosh & Das, 2015).

La filtración por vacío utiliza succión al vacío de un lado del filtro, la biomasa que se obtiene es semihúmeda. Los tambores de vacío son los más comunes para volúmenes grandes (Ghosh & Das, 2015; Shelef et al., 1984).

La filtración por presión utiliza filtros como prensa de placas y marcos o recipientes a presión. Se aplica cierta presión para forzar al líquido a que salga por el otro lado de un medio filtrante y así se va produciendo lo que se denomina torta filtrante. Algunos de estos filtros han mostrado eficacia variable, siendo los de cámaras y cestas cilíndricas los más recomendados por su eficiencia energética y confiabilidad (Ghosh & Das, 2015).

El sistema de ultrafiltración es usado para aplicaciones como alimento de ganado, lamentablemente el costo es muy elevado por lo que lo hace inviable para la mayoría de los casos (Shelef et al., 1984).

2.3.4. COAGULACIÓN-FLOCULACIÓN

La coagulación para la obtención de altas productividades es un proceso importante para el uso de las microalgas y la extracción de metabolitos de interés. La carga superficial de las microalgas es negativa por lo que las células se mantienen suspendidas y por ello se considera un reto la separación de la biomasa. La floculación se utiliza a menudo para aglomerar las microalgas, permitiendo los siguientes pasos de recolección: sedimentación, centrifugación, filtración y flotación (J. Y. Kim et al., 2022).

La floculación se puede lograr mediante tres métodos: floculación química, biofloculación y electrofloculación. Los floculantes más usados en el tratamiento de aguas y procesos de coagulación-floculación son el sulfato de aluminio, el cloruro de aluminio y el cloruro férrico. La adición de hidróxido de sodio eleva el pH del cultivo a 8-11, coagulando las células en tan solo unos minutos. Sin embargo, los floculantes son tóxicos en altas concentraciones (Pandey Ashok, Duu-Jong Lee, 2014). El uso de estos coagulantes químicos también daña los ecosistemas y se han asociado los residuos de aluminio con desordenes como Alzheimer. (Nimesha *et al.*, 2022).

Otros coagulantes poliméricos como la acrilamida es carcinogénica y neurotóxica. Añadido a estos problemas de salud, se suma la tasa baja de biodegradabilidad. (Kurniawan, 2020)

Una de las alternativas a estos problemas son los coagulantes naturales o biocoagulantes como alginatos, celulosa, almidones y quitosano.

2.3.5. BIOCOAGULACIÓN

Biocoagulación es la agregación de partículas coloidales o células inducida por la acción de agentes biológicos, como biopolímeros extracelulares (EPS), biocoagulantes naturales o microorganismos vivos, que neutralizan cargas superficiales y permiten la formación de flóculos o agregados más grandes y densos, facilitando su sedimentación o separación (Yin *et al.*, 2024).

El quitosano parece particularmente adecuado ya que es un recurso natural y renovable, muy abundante, biodegradable, biocompatible. Además, el quitosano se encuentra en uso a nivel laboratorio en el sector de la tecnología de microalgas como biofloculante. Este es sensible al pH, debido a la funcionalidad catiónica a lo largo de su esqueleto molecular que interactúa con la carga superficial negativa en las células microalgas, reduciendo la repulsión electrolítica y desestabilizando la suspensión de microalgas (Saliu *et al.*, 2021).

En la tabla 3 se muestran distintos biocoagulantes usados para la cosecha de biomasa microalgal

Tabla 3. Biocoagulantes utilizados en la cosecha de microalgas.

Biocoagulantes	Especie de microalga	Dosis/Condiciones	Eficiencia	Referencia
Quitosano	<i>Chlorella sp.</i>	10 mg·L ⁻¹ ; pH 5; 20 min sedimentación; 150 rpm	99.00%	(Ahmad et al., 2011a)
Quitosano	<i>Chlorella vulgaris</i>	10 mg·L ⁻¹ ; pH 5; 45 min floculación	99.10%	(Elcik et al., 2023)
Tanfloc MTH (tanino)	<i>Chlorella sp.</i> en medio salino	0.4–0.8 mg/mg biomasa	>75%	(Pappa et al., 2025)
Coagulante a base de taninos (TBC)	Microalgas en efluente de agua residual	100 mg·L ⁻¹	90.00%	(Konucu et al., 2022)
Moringa oleifera	<i>Chlorella vulgaris/ Desmodesmus sp.</i>	3,000 mg·L ⁻¹	91.00%	(Konucu et al., 2022)
Goma Cassia	<i>Chlamydomonas sp</i>	80 mg·L ⁻¹	92%	(Banerjee et al., 2014)
	<i>Chlorella sp</i>	35 mg·L ⁻¹	93%	(Banerjee et al., 2014)
Moringa oleifera		8,000 mg·L ⁻¹	75.50%	(Behera & Balasubramanian, 2019)
	<i>Chlorella sp.</i> , <i>Scenedesmus sp.</i> , <i>Cynocystis sp.</i> , y <i>Spirulina sp.</i>			(Behera & Balasubramanian, 2019)
Quitosano		150 mg·L ⁻¹	97.78%	(Balasubramanian, 2019)

Diversos estudios han reportado que el quitosano alcanza eficiencias de floculación superiores al 99 % a concentraciones relativamente bajas, particularmente en especies del género *Chlorella*. Ahmad et al. (2011a), obtuvo eficiencias cercanas al 99 % en *Chlorella sp.* y *Chlorella vulgaris* utilizando 10 mg·L⁻¹ y pH ácido, con tiempos cortos de floculación y sedimentación.

Los coagulantes basados en taninos, como el Tanfloc MTH, han demostrado ser alternativas eficaces en medios complejos, alcanzando eficiencias superiores al 75% en medios salinos

con dosis de 0.4 a 0.8 mg por mg de biomasa. Asimismo, se ha evaluado el uso de coagulantes a base de taninos (TBC) en efluentes de aguas residuales, logrando una remoción del 90% con dosis de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que subraya la versatilidad de estos compuestos en condiciones de cultivo no convencionales.

Por otro lado, biopolímeros derivados de plantas como la *Moringa oleifera* han sido probados en consorcios de microalgas. Aunque la *Moringa* es un recurso abundante, los estudios muestran que requiere dosificaciones significativamente más altas, que oscilan entre 3,000 y 8,000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para alcanzar eficiencias de entre el 75.5% y el 91%. Esta alta demanda de reactivo representa un desafío para la pureza de la biomasa final. En contraste, la Goma *Cassia* ha surgido como una opción competitiva, logrando un 92-93% de eficiencia en cultivos de *Chlamydomonas sp.* y *Chlorella sp.* con dosis moderadas de 35 a 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Los floculantes orgánicos se usan particularmente por su efectividad y costo además reducen la contaminación en la biomasa cosechada. Frente a la filtración y la centrifugación tiene la ventaja del tiempo mínimo del proceso y el costo. Los métodos electroquímicos se estudiaron para reducir los contaminantes químicos, pero resultaron un una energía invertida en el tren de tratamiento mayor.

2.4. QUITOSANO

El quitosano es un polisacárido lineal semi-cristalino que se obtiene de la desacetilación parcial de la quitina, el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa (Alipour *et al.*, 2020). La quitina es el componente estructural principal del exoesqueleto de crustáceos (camarones, cangrejos), la pared celular de hongos y el caparazón de insectos.

El proceso de obtención del quitosano involucra una hidrólisis alcalina de la quitina, generalmente con hidróxido de sodio concentrado a temperaturas elevadas. Esta reacción remueve grupos acetilo COCH_3 de los monómeros de N-acetilglucosamina, resultando en unidades de D-glucosamina con grupos amino libres $-\text{NH}_2$.

Por su origen natural y sus características (biodegradabilidad, baja toxicidad), el quitosano es un material clave en la química verde y las biorrefinerías (Renault *et al.*, 2009). No contamina la biomasa cosechada, ya que los polisacáridos similares a la quitina están

naturalmente presentes en la pared celular de muchas especies de microalgas, y por lo tanto, los productos extraídos de las células pueden ser utilizados directamente (Demir et al., 2020). Los mecanismos de acción que se llevan a cabo bajo la acción del quitosano los describe Renault et al, (2009). Menciona los cinco mecanismos naturales del biocuagulante, para desestabilizar las células microalgales:

1. Neutralización de cargas (Charge Neutralization)

El quitosano es un polielectrolito catiónico gracias la protonación de sus grupos amino ($-NH_3^+$) en medio ácido (pKa es de ~ 6.3), por lo que, al interactuar con partículas cargadas negativamente, neutraliza sus cargas superficiales. En otras palabras, reduce su potencial zeta y así disminuyen la repulsión electrostática y favorece la unión de las partículas.

En este caso las microalgas están cargadas negativamente por su estructura celular, por lo que la neutralización se efectúa. Esta reducción de la repulsión electrostática permite la agregación de las partículas y la formación de flóculos estables.

Este mecanismo es el principal cuando ocurre a pH's ácidos o moderados, ya que el grupo amino se protonan en este tipo de medio.

2. Punteo polimérico (Polymer Bridging)

El punteo polimérico se da gracias a las cadenas del quitosano que se absorben parcialmente una con otra y se forman estos puentes poliméricos entre partículas-agua-polímero. El mecanismo es predominante cuando la concentración del quitosano no es elevada ya que la saturación lleva a que el efecto se pierda igualmente se da cuando el peso molecular del quitosano es suficientemente alto para extenderse entre partículas. Su resultado da flóculos grandes, densos y sedimentables.

3. Barrido o atrapamiento en red (Sweep Flocculation / Enmeshment)

El quitosano puede atrapar partículas coloidales en una matriz gelatinosa y formar complejos insolubles o geles. Este efecto se puede dar con iones metálicos o a pH alto. Este mecanismo se le llama análogo del sulfato de aluminio o del cloruro férrico, pero con una matriz orgánica biodegradable.

4. Adsorción por interacciones químicas y físicas

Existen otro tipo de interacciones químicas y físicas como:

Puentes de hidrógeno

Interacciones de Van der Waals

Interacciones hidrofóbicas

Coordinación con grupos funcionales

Estas interacciones pueden contribuir con la estabilización de los flóculos y a la retención de contaminantes específicos (por ejemplo, colorantes o metales pesados).

5. Intercambio iónico y complejación

Los grupos amino del quitosano pueden formar complejos o intercambiar iones con especies aniónicas (fosfatos, sulfatos) o con metales pesados (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , etc.). Este mecanismo es relevante no solo en la coagulación física sino también en la remoción química de contaminantes. En este caso no se dá este tipo de mecanismo por la naturaleza de las microalgas y el medio en el que se cultivaron, suele ser posible en aguas residuales o aguas de otras matrices.

El quitosano actúa como coagulante natural multifuncional, capaz de combinar mecanismos electrostáticos (neutralización y puenteo) con fisicoquímicos (adsorción, complejación, atrapamiento), lo que explica su alta eficiencia en aguas con diferentes características de turbidez y carga orgánica.

Existen otros factores que influyen en estos mecanismos y en la Eficiencia del proceso de coagulación como:

- El grado de desacetilación (DD) del quitosano: cuanto mayor DD (más $-\text{NH}_2$ libre da paso a protonarse más $-\text{NH}_3^+$) mayor densidad de carga positiva, mejor la neutralización y la actividad.
- El peso molecular (MW) del quitosano: mayor MW favorece efecto bridging, aunque para ciertos contaminantes el efecto puede no depender tanto del MW.
- El pH de la solución: afecta el estado de protonación del quitosano (y su solubilidad/conformación). En pH por debajo de 5, quitosano está muy protonado,

cadena más extendida, pero puede dar flóculos más pequeños y sueltos. En pH neutro-ligeramente alcalino, la cadena puede estar menos cargada, pero formar flóculos más densos, por un efecto dado por una especie de distensión del polímero y atrapamiento de partículas.

- La dosis de quitosano: una dosis óptima es clave; dosis excesiva puede llevar a restabilización de la suspensión (por exceso de carga positiva) y empeorar el proceso.
- Fuerza iónica, concentración de partícula, naturaleza de la sustancia coloidal o disuelta, etc.

El quitosano ofrece una clara ventaja ambiental y de calidad de producto, ya que no introduce metales pesados o iones tóxicos a la biomasa, permitiendo un enfoque de biorrefinería. En contraste, los coagulantes inorgánicos (sulfato de aluminio o cloruro férrico) son más baratos, pero contaminan la biomasa y generan lodos peligrosos (Ali et al., 2025a). Su principal limitación es el alto costo y la dependencia del pH.

2.5. PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE MICROALGAS

Dentro de las varias formas de energía de las que se pueden transformar las microalgas, el biodiésel es prometedor gracias a que las características fisicoquímicas son similares al diésel del petróleo y que se puede utilizar en los motores diésel actuales sin realizar cambios en los sistemas (Chisti, 2007).

Las microalgas son candidatos potenciales comparados con las macroalgas por su mantenimiento. Las especies de microalgas como *Clorella sp*, *Chlorococcum sp*, *Scenedesmus sp*, etc., son ricos en lípidos y presentan tasas altas de crecimiento. La acumulación de lípidos dentro de las microalgas está influenciado por tres factores, viabilidad y consumo de nutrientes, condiciones de estrés las cuales ya están estudiadas, y modos de cultivo. Por otro lado, la cantidad y calidad del biodiésel está afectado por los pretratamientos, técnicas de extracción de lípidos y el proceso de transesterificación (Goh et al., 2019; Shelef et al., 1984).

Los ácidos grasos de las algas verdes pueden convertirse en biodiésel, el cual es renovable, biodegradable, no tóxico y un combustible amigable con el medio ambiente. Tiene ventajas

como que emite 78% menos carbón cuando se quema, 98% menos de azufre y 50% de material particulado (Pandey Ashok, Duu-Jong Lee, 2014).

La primera etapa para producir biodiésel es la extracción de lípidos para su posterior transesterificación, donde se obtiene el biodiésel como producto y glicerol. Existen distintas técnicas de extracción de lípidos la Blingh and Dyer, Flolch y la de Soxhlet (Pandey et al., 2024). Estas requieren la biomasa seca y usan solventes para su extracción como cloroformo, metanol, isopropanol, hexano, entre otros.

2.6. TRANSESTERIFICACIÓN

La transesterificación es la reacción química fundamental para la conversión de lípidos en biodiesel, se convierte una molécula de triglicérido en tres moléculas de éster y glicerol, generalmente haciendo uso de catalizadores ácidos o básicos. El metanol es el alcohol más empleado en este procedimiento debido a su bajo costo y capacidad para generar ésteres de ácidos grasos, también conocidos como biodiésel (Pandey et al., 2024). Usualmente la reacción requiere metanol, ácido y catalizador alcalino y así se obtiene glicerol y ésteres metílicos de ácidos grasos. En la figura 5 se muestra la reacción típica en este caso con KOH como catalizador de la reacción.

La estequiometría de la reacción requiere tres moles de alcohol por cada mol de triglicérido para producir tres moles de ésteres metílicos y un mol de glicerol.

Dado que se trata de una reacción reversible, es práctica común utilizar un exceso de alcohol para desplazar el equilibrio hacia la derecha y maximizar el rendimiento de FAMES (Ma & Hanna, 1999).

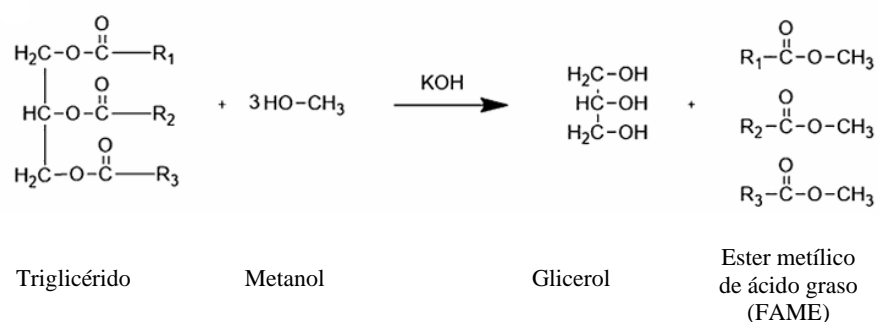


Figura 5. Reacción de transesterificación (adaptado de: Halim et al., 2012)

La eficiencia de la transesterificación depende intrínsecamente del tipo de catálisis empleada, la cual se selecciona en función de la calidad de la materia prima lipídica.

Transesterificación básica: Utiliza hidróxidos o metóxidos de sodio o potasio (NaOH, KOH). Es el método más rápido y económico a escala industrial, logrando altas conversiones en tiempos cortos (30-60 minutos) bajo condiciones moderadas de temperatura (Miao & Wu, 2006). En esta reacción el grupo -OH del metanol o etanol genera un alcóxido nucleofílico que reacciona con el carbono electrófilo del grupo -C=O de los triglicéridos.

Sin embargo, es altamente sensible a la presencia de agua y ácidos grasos libres (FFA).

El método más común en la industria es el uso de catálisis homogénea con catalizadores básicos, los más usados son el KOH y NaOH. La reacción bajo estas condiciones requiere temperaturas bajas al igual que presiones bajas. Los riesgos de este tipo de reacciones es la formación de jabones cuando existen ácidos grasos libres (FFA), la base reacciona con este y se da la formación de jabones. Se sugiere un contenido menos al 2% peso de FFA'a para evitar lo anterior (Halim et al., 2012; J. Kim et al., 2013).

Transesterificación Ácida: Emplea ácidos fuertes como el sulfúrico (H_2SO_4) o clorhídrico (HCl). Aunque la cinética es significativamente más lenta y requiere mayores temperaturas, es esencial cuando la materia prima presenta un alto índice de acidez, ya que cataliza simultáneamente la esterificación de los FFA y la transesterificación de los triglicéridos, evitando la formación de jabones (Vyas et al., 2010).

En reacciones mediadas por ácidos, el carbono protonado del grupo carbonilo de los triglicéridos reacciona con el grupo -OH del solvente, formando un intermediario tetraédrico.

Transesterificación Enzimática: Utiliza lipasas como biocatalizadores. Aunque permite condiciones suaves y fácil recuperación del glicerol, su alto costo y tiempos de reacción prolongados limitan su uso masivo actual.

Transesterificación In Situ: Este método combina la extracción de lípidos y la reacción química en un solo paso, aplicando el alcohol y el catalizador directamente sobre la biomasa.

Es particularmente relevante en microalgas para reducir costos energéticos asociados a la extracción previa.

El pH del medio de reacción juega un papel dual y crítico en la estabilidad de los productos. En un entorno básico (pH alto), la reacción es veloz, pero la presencia de humedad o un alto contenido de FFA puede desviar la ruta hacia la saponificación (formación de jabones), lo que consume catalizador, reduce el rendimiento de ésteres y dificulta la separación del glicerol. Por otro lado, un pH ácido evita la saponificación, pero si no se controla adecuadamente, puede inducir una hidrólisis parcial de los triglicéridos hacia mono- y diglicéridos en lugar de completar la conversión a FAMES, especialmente si la eliminación de agua no es eficiente (Demirbas, 2009b).

A diferencia de los aceites vegetales convencionales (soja, colza), los lípidos de microalgas presentan desafíos únicos. Aunque especies como *Haematococcus pluvialis* poseen un alto contenido de triglicéridos bajo condiciones de estrés, estos lípidos se encuentran protegidos por paredes celulares rígidas y complejas. Esto obliga a incluir etapas de pretratamiento (ruptura celular) y extracción con solventes, procesos que pueden arrastrar impurezas no lipídicas (pigmentos como la astaxantina, carbohidratos) que interfieren en la estequiometría de la transesterificación (Mata et al., 2010).

Para optimizar la obtención de biodiésel a partir de microalgas, se deben controlar rigurosamente las siguientes variables:

- Relación Molar Alcohol/Aceite: Si bien la teoría dicta 3:1, experimentalmente se requieren relaciones de 6:1 o superiores para aceites de microalgas debido a la resistencia a la transferencia de masa.
- Temperatura y Tiempo: La reacción suele llevarse a cabo cerca del punto de ebullición del alcohol (aprox. 60°C para metanol). Tiempos insuficientes resultan en conversión incompleta, mientras que tiempos excesivos pueden favorecer reacciones inversas.
- Concentración de Catalizador: Un exceso no mejora la velocidad y complica la purificación

- Mezcla y Cinética: Dado que el alcohol y el aceite no son miscibles inicialmente, la agitación vigorosa es fundamental para iniciar la reacción. En este estudio, el control de la mezcla asegura que la cinética no esté limitada por la difusión.

2.7. ESTADO DEL ARTE

La producción de biodiésel de microalgas en la actualidad cuenta con retos en cada una de las etapas, una de las más importantes es el costo del diseño y la energía que se invierte en la etapa de cosecha (Pandey et al., 2024).

La transición hacia biocombustibles de tercera generación se ha fundamentado en la capacidad de las microalgas para superar las limitaciones de los cultivos terrestres (soja, palma), específicamente en términos de productividad por área y no competencia alimentaria. Sin embargo, el consenso científico actual señala que la viabilidad económica del biodiésel de microalgas sigue siendo el principal obstáculo.

Haematococcus pluvialis es una microalga unicelular que es conocida por su alto contenido de astaxantina (Zhao et al., 2019). Contiene entre el 36 y el 40 % de su peso en seco de carbohidratos y 32 - 37% de lípidos en la fase roja (Grewe & Griehl, 2012). Pueden obtenerse productos como bioetanol, biodiésel, alimento para ganado, etc.

H. pluvialis sintetiza lípidos en forma de lípidos neutros, fosfolípidos y glicolípidos. Esta microalga puede contener aproximadamente 59%, 23.7%, y 11.5% de lípidos neutros, fosfolípidos y glicolípidos respectivamente en la fase verde y en la roja corresponde al rango de 51.9-23.5%, 20.6-21.1% y 25.7-26.5% (Grewe & Griehl, 2012).

La microalga *Haematococcus pluvialis* experimenta una transformación estructural profunda que impacta directamente en la eficiencia de la disrupción celular. En la etapa verde o vegetativa, la célula está rodeada por una matriz extracelular gelatinosa y flexible. Bioquímicamente, esta envoltura es predominantemente proteica, con un contenido de proteínas de aproximadamente el 75% y carbohidratos cercanos al 19% (Abomohra et al., 2016; Taylor et al., 2011). Debido a esta composición delgada y elástica, la disrupción celular en la fase verde es significativamente más sencilla y requiere menor gasto energético.

Por el contrario, la etapa roja o de aplanóspora desarrolla una pared celular extremadamente robusta, con un grosor de entre 1.8 y 2.2 μm (Hagen *et al.*, 2002). En esta fase, la composición se altera radicalmente: los carbohidratos (principalmente mananos) ascienden al 70%, mientras que las proteínas caen al 6% (Hagen *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2011). El componente crítico es el algaenano, un polímero similar a la esporopolenina presente en la capa trilaminar que actúa como una barrera impenetrable. Para liberar compuestos como la astaxantina en esta etapa, se requieren métodos mecánicos de alta presión, como la prensa francesa a 10,000–30,000 psi, ya que la pared intacta impide la bioabsorción de los nutrientes (Hagen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2015).

H. pluvialis exhibe un perfil complejo de ácidos grasos que incluyen ácidos palmítico, oleico, linoleico y linolénico en cantidades importantes con un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (J. H. Kim *et al.*, 2015). Sin embargo, la composición de ácidos grasos es específica de la cepa y se ve afectada por las condiciones de cultivo y el modo de crecimiento.

No se han realizado estudios con suficiente respaldo sobre la respuesta del quitosano en la transesterificación y no se encontró en bibliografía estudios sobre el efecto en la transesterificación, solo del efecto emulsificante en aceites (Rodríguez, 2002; Schulz *et al.*, 1998).

En este contexto, *Haematococcus pluvialis* ha sido históricamente relegada a la producción de nutracéuticos (astaxantina) de alto valor. Li *et al.* (2020) proponen el modelo de "biorrefinería", donde la extracción de lípidos para energía no es el fin único, sino un valor agregado al residuo de la biomasa post-extracción de pigmentos. Este estado del arte analiza las tecnologías actuales, contrastando eficiencias y evidenciando las brechas técnicas que aún persisten en la integración de las etapas de cosecha y transesterificación.

Si bien la literatura clásica (Chisti, 2007) establece que el contenido lipídico de *H. pluvialis* oscila entre el 30-40% bajo estrés, existe discrepancia sobre la calidad de estos lípidos para fines energéticos. Mientras que Zhang *et al.* (2021) argumentan que el perfil de ácidos grasos enriquecido en oleico y linoleico durante la fase roja es ideal para biodiesel, otros investigadores advierten que la acumulación simultánea de astaxantina esterificada complica

la purificación, requiriendo pasos adicionales que penalizan el balance energético. El alto contenido de lípidos neutros (hasta 59% en fase verde y 51.9% en fase roja) y el perfil complejo de ácidos grasos (palmítico, oleico, linoleico y linolénico) de *H. pluvialis* (Grewe & Griehl, 2012; J. H. Kim *et al.*, 2015) la posicionan como una fuente prometedora, si se logra superar la complejidad de su matriz celular.

En cuanto al diseño de los reactores, se sabe que a pesar de varios desafíos que tiene los raceways y reactores abiertos, son más rentables y abarcan mayor superficie (Russell *et al.*, 2022).

Los reactores abiertos, para la producción bioenergéticos, son usados a gran escala por su producción alta de biomasa, se ha reportado que para microalgas como *C. minutissima* en reactores de 1,500 L se ha obtenido hasta el 90.21% de rendimiento de biodiésel, mientras que *Chlorella vulgaris* en reactores del mismo tipo obtuvo un 84.03% de rendimiento. Para *Scenedesmus obliquus* se obtuvo una productividad de biomasa de 13.12 g/m²/día y una productividad lipídica de 1,39 g/m²/día en estanque de canal cerrado de 40m³ (Pandey *et al.*, 2024). Los artículos en cuanto a los sistemas de cultivo tradicionales se encuentran más estudiados en comparación con los de cosecha por métodos más actuales y con menos energía requerida para su transformación.

La cosecha de microalgas se realiza por distintos métodos, biológicos, químicos, eléctricos y mecánicos como la flotación, sedimentación, floculación, etc. Sin embargo, estos métodos tradicionales tienen altos costos por la energía invertida y los altos volúmenes de microalgas en suspensión (L. Peng *et al.*, 2020b).

La cosecha representa el 20-30% del costo total de producción. Mientras que la centrifugación es el estándar técnico, su demanda energética (8 kWh/m³) la hace insostenible para commodities energéticos (Xu *et al.*, 2021). Aquí surge el debate sobre la coagulación-floculación, siendo el quitosano el principal foco de la química verde.

La floculación destaca entre los métodos de cosecha por los bajos costos de material y energía. Existe una gran variedad de floculantes para cada cultivo de microalga (Q. Wang *et al.*, 2021). Los comúnmente usados en tratamiento de agua residuales, también es usada la poliacrilamida catiónica y los floculantes naturales como el quitosano. Chen y colaboradores

lograron cosechar el 90% de la biomasa de *Scenedesmus sp.* con una concentración de quitosano de 0.08g/L y de 0.15 g/L de FeCl (L. Chen et al., 2013), mientras que Lama y colaboradores para la misma especie se lograron cosechar el 100% de biomasa con una concentración de quitosano de 0.06 g/L (Lama et al., 2016). El floculante puede no aplicarse exitosamente en algunas especies, por lo que se requiere una evaluación precisa para cada especie y condiciones particulares de cosecha y cultivo.

El quitosano es un polielectrolito catiónico obtenido por desacetilación de la quitina, que es el segundo biopolímero más abundante en el mundo (Renault et al., 2009) y ha demostrado ser muy eficaz para eliminar del agua tanto las algas de agua dulce como las algas marinas (Divakaran & Sivasankara Pillai, 2002). A diferencia de las sales metálicas, el quitosano no es tóxico, es biodegradable, renovable y ecológicamente aceptable (Renault et al., 2009). Por tanto, se prevé que su uso para el procesamiento de la biomasa y posterior obtención de biocombustible no representará un problema. Sin embargo, aunque se ha estudiado ampliamente, el mecanismo de floculación de las células de algas con quitosano y la eficiencia del proceso depende de las propiedades de las algas y las condiciones de cultivo utilizadas en cada estudio (Lama et al., 2016).

Los estudios sobre quitosano son mayores para el tratamiento de aguas residuales y se carece de una amplia bibliografía. La tabla 4 muestra los estudios realizados para cosecha de microalgas haciendo uso de quitosano.

Tabla 4. Condiciones de floculación de distintas especies de microalgas con quitosano

Microalga	Concentración de quitosano (mg L⁻¹)	pH	Tiempo de mezcla (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Eficiencia (%)	Referencia
<i>Scenedesmus sp.</i>	10	7	3	150	94.71	(Rasweefali et al., 2024b)
<i>Coccomyxa sp</i>	7.5	-	-	-	97	(Q. Wang et al., 2021)
<i>Chlorella vulgaris</i>	25	-	-	-	92	(Q. Wang et al., 2021)
<i>Consorcio de scenedesmus</i>	20	8	23	10	98.01	(Suastes-Rivas et al., 2024)

<i>Chlorella sp</i>	10	7	20	150	99	(Ahmad et al., 2011b)
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	5	1	100	99.10	(Elcik et al., 2023)

La cosecha de microalgas mediante floculación se ha consolidado como una alternativa eficiente y de menor consumo energético frente a métodos convencionales como la centrifugación. Entre los coagulantes naturales evaluados, el quitosano ha recibido especial atención debido a su carácter biodegradable, baja toxicidad y alta afinidad electrostática con la superficie celular de las microalgas, generalmente cargada negativamente.

Diversos estudios han reportado altas eficiencias de recuperación de biomasa utilizando quitosano bajo diferentes condiciones operativas y para distintas especies de microalgas (tabla 4). Rasweefali *et al.* (2024b) reportaron una eficiencia de floculación de 94.71 % para *Scenedesmus sp.* empleando una concentración de quitosano de 10 mg L⁻¹, a pH neutro y con tiempos de mezcla cortos, lo que evidencia la rápida interacción entre el polímero y la superficie celular. De manera similar, Wang *et al.* (2021) observaron eficiencias superiores al 90 % para *Coccomyxa sp.* y *Chlorella vulgaris* utilizando concentraciones de quitosano entre 7.5 y 25 mg L⁻¹, aunque sin detallar las condiciones de pH y agitación, lo que limita la reproducibilidad de estos resultados.

Por otro lado, Suastes-Rivas *et al.* (2024) evaluaron la floculación de un consorcio de *Scenedesmus* a pH ligeramente alcalino, alcanzando eficiencias cercanas al 98 % con bajas velocidades de agitación, lo que sugiere que el quitosano puede mantener su desempeño incluso bajo condiciones suaves de mezcla. Ahmad *et al.* (2011a) reportaron eficiencias de hasta 99 % para *Chlorella sp.* a pH 7, empleando tiempos de mezcla mayores y velocidades de agitación elevadas, destacando la influencia de las condiciones hidrodinámicas en la formación de flóculos estables.

En conjunto, la literatura demuestra que el quitosano permite alcanzar altas eficiencias de cosecha para diversas microalgas en un amplio rango de condiciones operativas. No obstante,

la mayoría de los estudios se enfocan únicamente en la eficiencia de floculación, sin analizar de forma integral el impacto de estas condiciones sobre etapas posteriores como la extracción de lípidos, la calidad de los FAMES o la huella de carbono del proceso, lo que evidencia la necesidad de estudios que integren criterios técnicos, químicos y ambientales, como el abordado en la presente investigación.

La extracción de lípidos constituye una de las etapas clave en la producción de biodiésel a partir de microalgas, ya que el rendimiento y la composición del extracto lipídico determinan directamente la eficiencia de la posterior transesterificación. La literatura reporta una amplia variedad de técnicas de extracción, las cuales difieren en el tipo de solvente, las condiciones de operación, el tiempo de contacto y la eficiencia de recuperación, dependiendo tanto de la especie microalgal como de la estructura de su pared celular (tabla 5). Los métodos de extracción (Soxhlet, Bligh & Dyer) siguen siendo el estándar de referencia analítica, dado que los solventes utilizados (hexano, cloroformo, metanol) ofrecen la mejor afinidad para lípidos neutros y polares, resultando en alta recuperación. La tabla 5 muestra las condiciones y el rendimiento de lípidos bajo distintas técnicas de extracción.

Tabla 5. Extracción de lípidos de microalgas bajo distintas técnicas

Microalga	Método de extracción	Parámetros	Tiempo (min)	Rendimiento de lípidos (% peso)	Fuente
<i>Chlorella sp</i>	Soxhlet con n-hexano	69 °C	180	4.99	(Ramluckan et al., 2014)
<i>Scenedesmus sp</i>	Estática con Hexano	25 °C	180	4	(Solana et al., 2014)
<i>Chlorella sp</i>	Soxhlet con cloroformo	61.5 °C	180	3.49	(Ramluckan et al., 2014)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Soxhlet con metanol:cloroformo 2:1	105 °C	1080	14.84	(Solana et al., 2014)
<i>Scenedesmus sp.</i>	Bligh and Dyer con Cloroformo:Metanol:Agua 1:1:0.9	25 °C	120	14.5	(Ramluckan et al., 2014)
<i>Isochrysis galbana</i>	Estática: Cloroformo: Metanol:Agua 1:2:0.8	25 °C	60	8.9	(Grima et al., 1994)
<i>Botryococcus braunii</i>	Agitación con perlas: Chloroform:methanol 2:1	25 °C	120	28.1	(Lee et al., 2010)
<i>Chlorella sp</i>	Soxhlet chloroform:ethanol 1:1	61.5 °C	180	11.76	(Ramluckan et al., 2014)

<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	Estática con Etanol	25 °C	1440	6.3	(Grima et al., 1994)
<i>Chlorella sp.</i>	Soxhlet con Etanol	78.5 °C	90	5.71	(Ramluckan et al., 2014)
<i>Chlorococcum sp.</i>	Estática con Hexano:isopropanol (3:2)	25 °C	450	6.8	(Halim et al., 2011)

Entre los métodos convencionales, la extracción Soxhlet ha sido ampliamente utilizada debido a su alta reproducibilidad y capacidad para recuperar lípidos totales. Ramluckan *et al.* (2014) reportaron rendimientos lipídicos entre 3.49 y 11.76 % en *Chlorella sp.* empleando Soxhlet con distintos solventes, observándose que la combinación de solventes polares y no polares, como cloroformo-etanol, incrementa significativamente el rendimiento en comparación con solventes individuales como hexano o etanol. Sin embargo, este método requiere temperaturas elevadas y tiempos prolongados, lo que incrementa el consumo energético y limita su aplicación a gran escala.

En contraste, los métodos de extracción estática a temperatura ambiente han sido propuestos como alternativas de menor demanda energética. Solana *et al.* (2014) reportaron rendimientos cercanos al 4 % para *Scenedesmus sp.* utilizando hexano a 25 °C, mientras que Grima *et al.* (1994) obtuvieron rendimientos de hasta 8.9 % en *Isochrysis galbana* empleando mezclas de cloroformo, metanol y agua, lo que resalta la importancia de la polaridad del sistema solvente para favorecer la solubilización de diferentes clases lipídicas. De manera similar, Halim *et al.* (2011) demostraron que el uso de mezclas binarias como hexano:isopropanol permite mejorar la recuperación lipídica en *Chlorococcum sp.* bajo condiciones normales de operación.

Por otro lado, técnicas que incorporan una etapa de disrupción celular, como la agitación con perlas, han mostrado rendimientos significativamente mayores. Lee *et al.* (2010) reportaron una recuperación de hasta 28.1 % en *Botryococcus braunii*, evidenciando que la resistencia de la pared celular es un factor determinante en la eficiencia de extracción. No obstante, estos métodos implican un mayor consumo energético y complejidad operativa.

En conjunto, los estudios reportados muestran que no existe una técnica universalmente óptima para la extracción de lípidos de microalgas, ya que el rendimiento depende de la

especie, el método de extracción y las condiciones operativas. Asimismo, la mayoría de los trabajos se enfocan en maximizar el rendimiento lipídico, sin considerar la influencia de las etapas previas de cosecha ni el impacto ambiental del proceso, lo que justifica la evaluación integrada de la cosecha con quitosano y la extracción lipídica abordada en la presente investigación.

La transesterificación constituye la etapa final y determinante en la producción de biodiésel a partir de microalgas, ya que permite convertir los triglicéridos presentes en los lípidos extraídos en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs), compuestos con propiedades fisicoquímicas adecuadas para su uso como biocombustible. La eficiencia de esta reacción depende principalmente del tipo de catalizador, del alcohol empleado, de las condiciones de operación y de la composición del extracto lipídico (tabla 6).

Tabla 6. Tipos de catálisis y eficiencias de FAMEs con distintas microalgas

Microalga	Catalizador	Tipo de catálisis	Alcohol	Eficiencia FAMEs (%)	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	NaOH	Básica	Metanol	70–90%	(Mata et al., 2010)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	H ₂ SO ₄	Ácido	Metanol	~80%	(Leung et al., 2010)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	KOH	Básica	Metanol	86–95%	Cheng et al. (2013)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Lipasa	Enzimática	Etanol	60–80%	(Mata et al., 2010)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	CaO	Heterogénea	Metanol	85–92%	(Rawat et al., 2013)
<i>Chlorella protothecoides</i>	NaOH directa	Básica	Metanol	~80%	(Chisti, 2007)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Microondas + NaOH	Básica	Metanol	>90%	Cheng et al. (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrasonido + H ₂ SO ₄	Ácida	Metanol	~87%	(Mata et al., 2010)

La catálisis básica es una de las rutas más empleadas debido a su alta velocidad de reacción y elevadas eficiencias de conversión. Estudios reportados para *Chlorella vulgaris* y

Scenedesmus obliquus indican eficiencias de FAMEs entre 70 y 95 % utilizando hidróxidos alcalinos como NaOH y KOH en presencia de metanol (Mata *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2013). De manera similar, Chisti (2007) reportó conversiones cercanas al 80 % mediante transesterificación directa con NaOH, lo que evidencia la viabilidad de este tipo de catálisis para lípidos microalgales. No obstante, la presencia de ácidos grasos libres y humedad puede favorecer reacciones secundarias de saponificación, afectando la eficiencia del proceso.

La catálisis ácida ha sido propuesta como alternativa para sistemas con altos contenidos de ácidos grasos libres, aunque generalmente requiere tiempos de reacción mayores. Leung *et al.* (2010) reportaron eficiencias cercanas al 80 % para *Nannochloropsis oculata* empleando H₂SO₄ como catalizador, mientras que Mata *et al.* (2010) demostraron que la combinación de ultrasonido y catálisis ácida permite alcanzar eficiencias de hasta 87 % en *Chlorella vulgaris*, mejorando la transferencia de masa y la cinética de reacción.

Por otro lado, la catálisis heterogénea y enzimática ha sido explorada con el objetivo de reducir etapas de separación y facilitar la reutilización del catalizador. Rawat *et al.* (2013) reportaron eficiencias de 85 a 92 % utilizando CaO como catalizador heterogéneo en *Chlorella pyrenoidosa*, mientras que el uso de lipasas mostró eficiencias moderadas (60–80 %) en *Nannochloropsis* sp., aunque con mayores costos asociados (Mata *et al.*, 2010). Asimismo, técnicas asistidas por microondas han demostrado incrementar la eficiencia de conversión, alcanzando valores superiores al 90 % (Cheng *et al.*, 2013).

En conjunto, la literatura evidencia que la transesterificación básica con metanol sigue siendo la opción más eficiente y ampliamente utilizada para la obtención de FAMEs a partir de microalgas. Sin embargo, la mayoría de los estudios se centran en optimizar la reacción de forma aislada, sin considerar la influencia de las etapas previas de cosecha y extracción sobre la calidad del sustrato lipídico, lo que resalta la importancia de evaluaciones integradas como la desarrollada en la presente investigación.

Como se mostró en este capítulo, no se encuentra información suficiente en la literatura acerca del efecto del quitosano en la transesterificación con *Haematococcus pluvialis*, así como de las condiciones de cosecha con quitosano para la microalga que permita tomar

decisiones en cuanto a diseño de procesos de obtención de biodiésel, por lo que es imprescindible ampliar la literatura.

Tras el análisis crítico de la literatura, se identifican las siguientes brechas de conocimiento que justifican la presente investigación, especialmente en la integración de procesos para *H. pluvialis*:

- **Desconexión entre Cosecha y Conversión:** La mayoría de los estudios optimizan la floculación o la transesterificación de forma aislada. No existe evidencia concluyente sobre cómo el pH de floculación con quitosano afecta la calidad del lípido extraído y su posterior conversión a FAMES. Además, no se encuentra información suficiente acerca de las condiciones de cosecha con quitosano para *H. pluvialis* que permitan el diseño óptimo de procesos de obtención de biodiésel.
- **Influencia de la Matriz Biológica/Quitosano:** Se desconoce si los remanentes de quitosano actúan como interferentes o coadyuvantes en la transesterificación ácida de *H. pluvialis*, especialmente en un esquema in situ.
- **Necesidad de Métodos Integrados:** Falta validar metodologías que integren el monitoreo rápido por FT-IR con diseños experimentales estadísticos (Box-Behnken) para optimizar el proceso globalmente, no solo por etapas.

Esta tesis pretende cubrir estos vacíos, proponiendo un esquema integral que evalúe la viabilidad de utilizar quitosano no solo como agente de cosecha, sino como parte de un tren de procesos compatible con la obtención de biocombustibles de alta calidad, maximizando la conversión de lípidos para su posterior transesterificación y obtención de biodiesel.

Capítulo 3. Metodología

En este capítulo se describen los materiales y métodos utilizados, así como los análisis realizados a lo largo de la experimentación.

La metodología se divide en 3 etapas principales (figura 6):

1. Cultivo de MA: En el cual se realizó el crecimiento de la biomasa de MA y a través de cinéticas se determinó el tiempo de cultivo.
2. Cosecha de MA: En esta etapa se separa la biomasa de su fase acuosa por medio de coagulación con quitosano (pruebas de jarras) y centrifugación para llevarla a la etapa 3.
3. Extracción-Transesterificación de biomasa MA: Esta es la última etapa en la cual se extrajeron los lípidos para finalmente realizar la conversión a FAMES.

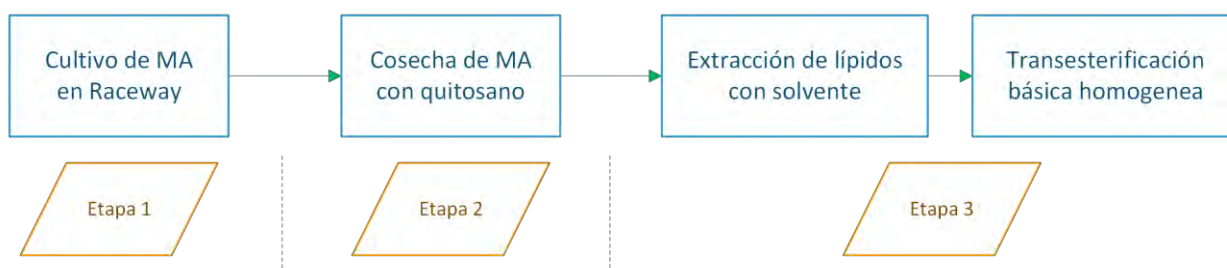


Figura 6. Etapas de metodología de la investigación.

3.1. ETAPA 1. CULTIVO Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE MICROALGAS

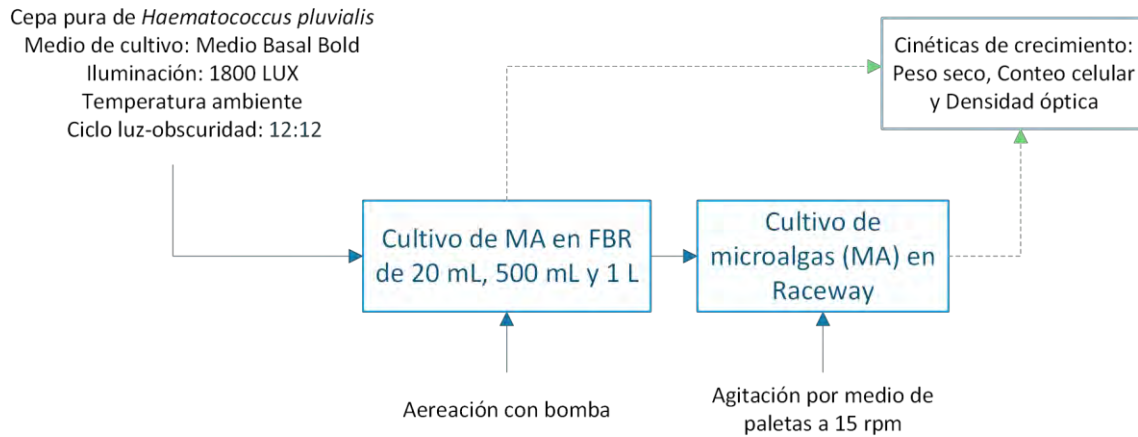


Figura 7. Etapa 1 de la metodología de la investigación.

La metodología general mostrada en la figura 7 consiste en el cultivo de la cepa pura de microalgas, en su escalamiento para cultivo en raceway y en la generación de cinéticas de crecimiento.

El cultivo de la cepa pura se realizó en laboratorio, con condiciones ambientales sin controlar (humedad, temperatura, CO₂ ambiental), lo que quiere decir que las condiciones ambientales determinaban todas estas variables.

Se partió de 4 mL de la cepa pura de *Haematococcus pluvialis*, otorgada por el Instituto de Energías Renovables (IER) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El medio de cultivo usado fue Medio Basal Bold (BBM) el cual tiene como función aportar los micro y macronutrientes necesarios para su crecimiento (Bischoff & Bold, 1963). El cultivo en la primera etapa se realizó en fotobiorreactores de 150 mL, 0.5 L para después escalarlo a 1 L y así crecer el inóculo inicial. El cultivo en la segunda subetapa se realizó en un reactor de tipo raceway con paleta para su aireación y una capacidad máxima de 30 L de operación. En las dos etapas se realizaron cinéticas de crecimiento microalgal para determinar el peso seco, conteo celular y densidad óptica

3.1.1. CONDICIONES DE CULTIVO

Para llevar a cabo el cultivo de microalgas se requirió matraces Erlenmeyer de 150 mL (figura 8), reactores de 1 L, bomba para inyección de aire ELITE® 800, medio de cultivo BBM que se muestra en la tabla 7, inóculo de cepa pura (*Haematococcus pluvialis*), parrilla con agitación y lámpara fluorescente (1800 luxes).

Tabla 7. Medio de cultivo BBM.

Compuesto	Concentración (g L ⁻¹)
Sales	
NaNO ₃	22.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	6.75
CaCl ₂ *H ₂ O	2.25
NaCl	2.25
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.441
EDTA	4.5
KOH	2.79
K ₂ HPO ₄	6.3
KH ₂ PO ₄	15.75
Metales traza	
H ₃ BO ₃	1.0278
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.7938
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.1296
Na ₂ MoO ₄	1.0773
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.1413
Co (NO ₃) ₂	0.0441

El crecimiento del cultivo se realizó en 0.50 L, para después escalarse a 1 L.

En esta etapa primero se esterilizó el material: fotobiorreactores de 1 L (Figura 8), mangueras de plástico, pipetas, medio de cultivo BBM y agua desionizada. Con los materiales estériles se montaron los fotobiorreactores y se inocularon al 20% (v/v) en medio de cultivo BBM al 80% (v/v). El fotobiorreactor se mantuvo en agitación, aireación y con un fotoperiodo de 12:12 luz oscuridad.



Figura 8. Reactores de 150 mL y 1 L

Para los reactores de 1 L se llevó a cabo la cinética de crecimiento en las que se monitoreó el peso seco, número de células y densidad óptica, en un periodo de 33 días para la de 0.5 L y de 20 días para la de 1 L. En la segunda subetapa se inoculó el raceway (20 L) con las microalgas del crecimiento de la primera subetapa. De la misma manera que en la primera etapa, se monitoreó peso seco, número de células, densidad óptica y lípidos, por 20 días. De esta subetapa se tomaron volúmenes de microalgas para realizar los experimentos de la etapa de cosecha.

Tabla 8. Cinéticas realizadas.

Código de cinética	Volumen (mL)	Tiempo (días)	Tipo de reactor
C. 1	500	35	FBR
C. 2	1,000	21	FBR
C. 3	25, 000	21	Raceway
C. 4	1,000	28	FBR
C. 5	25,000	30	Raceway
C. 6	25,000	30	Raceway
C. 7	30, 000	20	Raceway
C. 8	29,000	29	Raceway

Las cinéticas de crecimiento que se realizaron a lo largo de la investigación se resumen en la tabla 8, se presentan en orden cronológico. Para efectos del análisis únicamente se presentan y analizan las cinéticas C.1, C.3 y C.8, las cuales resultaron ser las más significativas, con mejor ajuste y las que no resultaron alteradas por cortes de energía o paros no programados. En la figura 9 se observan las etapas de escalamiento del inóculo. Teniendo el inóculo de la cepa pura de *Haematococcus pluvialis* de aproximadamente 4 mL (A), se procedió al

crecimiento de esta en 3 matraces a un volumen de 100 mL (C) posteriormente se inoculó en FBR de 500 mL (D) seguido de los FBR a 1,000 mL (E), para terminar con el cultivo en Raceway (F).

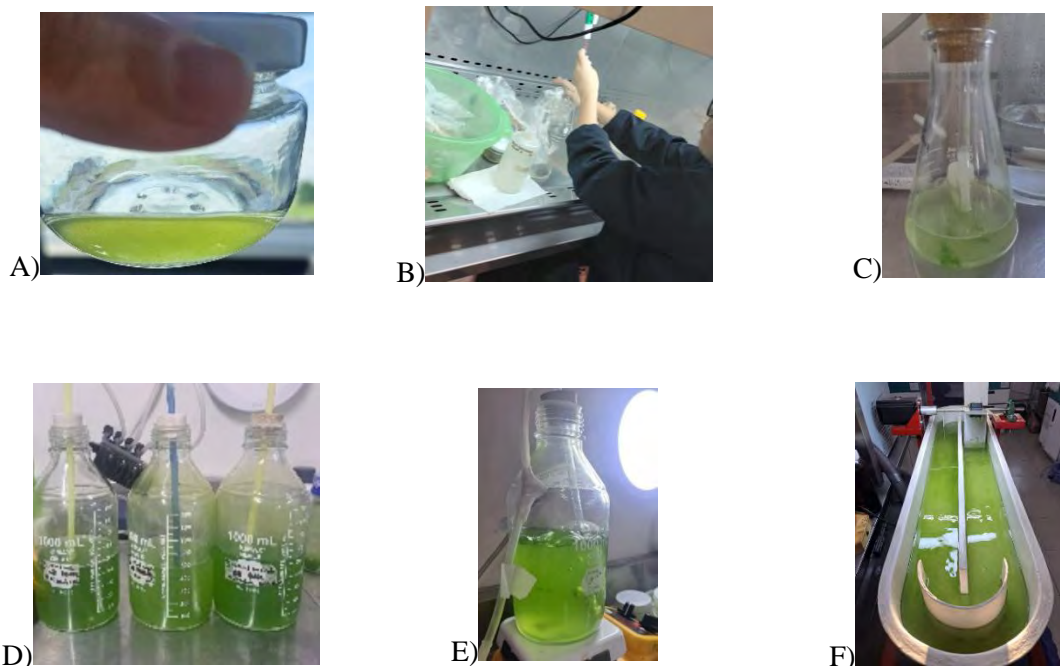


Figura 9. Etapas de crecimiento del inóculo.

3.1.2. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

PESO SECO

El peso seco es un parámetro con el que se puede observar los patrones de crecimiento microalgal, únicamente si éste es considerado como el aumento del contenido de biomasa; los datos obtenidos a través de este parámetro no necesariamente representan el grado de duplicación celular del cultivo. El contenido de peso seco se determinó mediante gravimetría como se describe a continuación (Phycology, 2004):

Las charolas de aluminio se llevan a peso constante dejándolas a 60 °C. Se llevaron a desecador por 20 min y se pesaron, se repitió el proceso hasta tener un peso constante (P_1). Se depositaron 5 mL de muestra y se regresan a la estufa a 60 °C por 12 h.

La muestra contenida en la charola se colocó en un desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente. Posteriormente se pesó la muestra seca hasta alcanzar el peso constante (P_2).

El peso seco de la muestra se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\text{Peso seco} = P_2 - P_1$$

Para el caso del contenido de biomasa de las muestras se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Biomasa MA} = \frac{\text{Peso seco (g)}}{\text{Muestra (L)}}$$

CONCENTRACIÓN CELULAR

Para el caso de la concentración celular se realizó por medio del conteo de células en cámara de Neubauer, con microscopio de luz. Se realizó el conteo en el objetivo 40 X. La cámara cuenta con 9 cuadrantes y divisiones, cada uno con 1 mm^2 y con profundidad de 1 mm. Dando un total en la cámara de $1 \mu\text{L}$. Por tanto, para determinar el número de células presentes en un volumen de 1 mL de cultivo (células mL^{-1}), es necesario multiplicar el número promedio de células por un factor de 10^4 . El conteo se realizó sumando el número de células en los cuatro cuadrantes de la cámara y mediante la siguiente ecuación se determina el número de células.

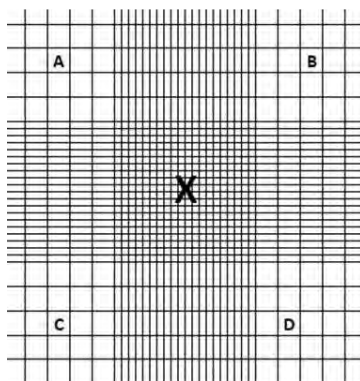


Figura 10. Esquema de la cámara de Neubauer.

$$\text{Células promedio} = A + B + C + D$$

$$\text{Concentración celular (células mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{células}_{\text{promedio}}) * (\text{dilución}) * 10^4}{1 \text{ (mL)}}$$

DENSIDAD ÓPTICA

La Densidad Óptica (DO) de la muestra se midieron con espectrofotometría de UV-VIS. Se midió a una absorbancia de 675 nm, con medio de cultivo (BBM) como blanco. Ocupándose un espectrofotómetro de UV-Vis marca ThermoScientific modelo BioMate™ 160.



Figura 11. Espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific™ BioMate™ 160.

Para esta etapa se calculó la tasa de crecimiento específica y se calculó de la siguiente manera (Ammar *et al.*, 2018):

$$\mu (d^{-1}) = \left(\frac{\ln X_t - \ln X_0}{t} \right)$$

Dónde:

μ : tasa de crecimiento específica (d^{-1})

X_t : Número de células al tiempo t (cel mL⁻¹)

X_0 : Número de células al tiempo 0 (cel mL⁻¹)

t : tiempo transcurrido entre X_t y X_0 (d)

3.2. ETAPA 2. COSECHA DE M.A.

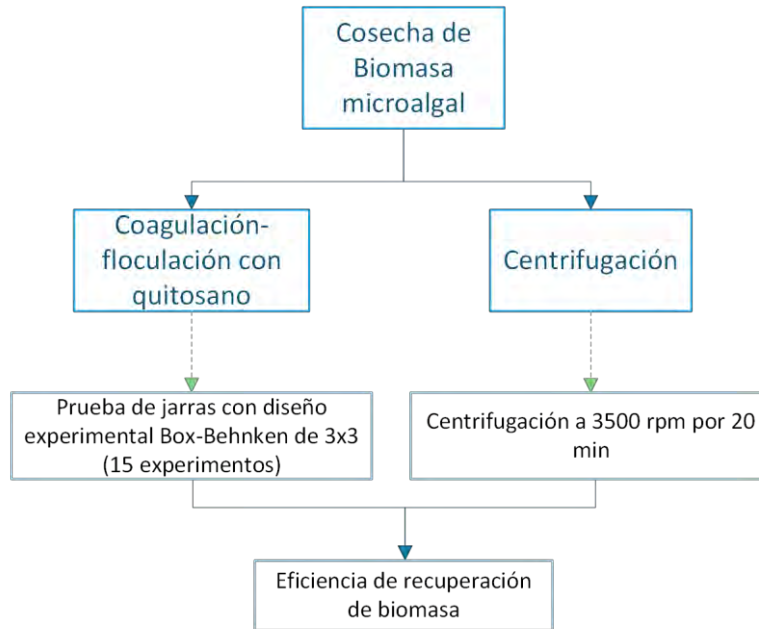


Figura 12. Diseño de experimentos etapa de cosecha.

Para esta segunda etapa se realizó la cosecha de *Haematococcus pluvialis*, a través de floculación asistida con quitosano, siguiendo un diseño experimental de tipo Box-Behnken, de 3 factores por 3 niveles y como respuesta la eficiencia de recuperación de la biomasa (ER) medida a través de la DO de las muestras. En la tabla 9 se muestran los experimentos resultantes de este diseño.

Tabla 9. Diseño experimental para prueba de jarras.

Jarra #	Quitosano (mg L ⁻¹)	pH	Velocidad de agitación (rpm)
1	5	4	70
2	15	4	70
3	5	10	70
4	15	10	70
5	10	7	70
6	10	7	70
7	5	7	20
8	15	7	20
9	10	4	20
10	10	10	20

11	5	7	120
12	15	7	120
13	10	4	120
14	10	10	120
15	10	7	70

El cultivo utilizado en esta etapa fue el resultante de la etapa 2 del raceway. Se mezclaron 4 cinéticas de crecimiento para lograr homogeneidad de la muestra y para lograr el triplicado de las pruebas, teniéndose un total de 45 experimentos.

Las pruebas de jarras consistieron en colocar 1 L del cultivo de microalgas en vasos de precipitado, el equipo permite hasta 6 al mismo tiempo (figura 13), se añadió NaOH (0.1 M) o HSO₄ (0.1 N) para llegar al pH y quitosano marcados en la tabla 4. La agitación se llevó a cabo por 1 min para todas las corridas, a las revoluciones marcadas en la tabla 9 respectivamente. Pasados 10 min y 30 min se tomó muestra del sobrenadante para el cálculo de la Eficiencia de Recuperación de la biomasa (ER)

Las muestras de los sobrenadantes se llevaron a espectrofotometría de UV-VIS y se leyeron como marca el apartado de densidad óptica (3.1.2).

La ER se calculó de acuerdo con la ecuación propuesta por (D.-Y. Kim *et al.*, 2017):

$$ER (\%) = \left(\frac{OD_i - OD_f}{OD_i} \right) \times 100$$

Dónde:

ER: Eficiencia de recuperación de biomasa (%)

OD_i: Absorbancia antes de la floculación (675 nm)

OD_f: Absorbancia después de la floculación y sedimentación, 10 y 30 min (675 nm)

El quitosano se adicionó en el instante 0 de la prueba de jarras. Se preparó la solución madre adicionando 1 g de quitosano en 1 L de solución al 0.1 M de HCl y se disolvió por aproximadamente 1 h o hasta disolver completamente el quitosano.

Las pruebas de jarras en esta etapa se realizaron en un equipo Phipps & Bird el cual se muestra en la figura 13.

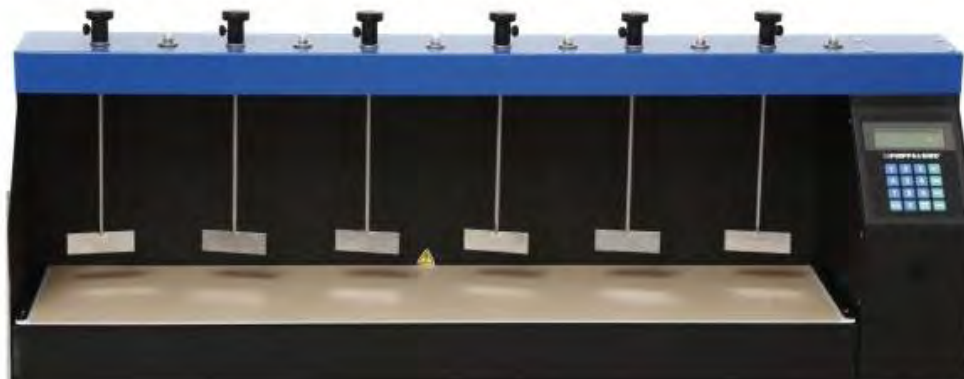


Figura 13 . Equipo Phipps & Bird para prueba de jarras.

3.3. ETAPA 3. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS Y TRANSESTERIFICACIÓN CONVENCIONAL.

Para esta etapa 3 de experimentación se dividió en dos subetapas principales el escalamiento la de coagulación (figura 14) y la de extracción y transesterificación de los lípidos microalgales figura 15).

En la etapa 2 se obtuvieron las mejores condiciones de operación para la coagulación con quitosano mediante el RSM, estas condiciones se tomaron para realizar el escalamiento de la prueba de coagulación como se muestra en la figura 14. Como resultado de esta subetapa se obtuvieron 3 muestras: Biomasa coagulada a pH 4 (B_4), biomasa coagulada a pH 10 (B_10) y biomasa centrifugada (B_CC).

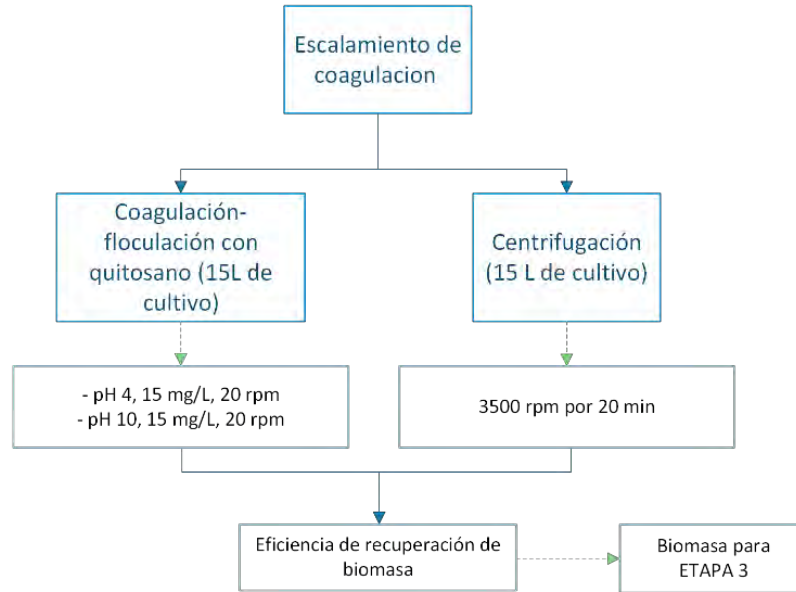


Figura 14. Diseño de experimentos etapa de escalamiento de coagulación.

Para esta subetapa de escalamiento se realizó la cuantificación de la huella de carbono para evidenciar las diferencias entre la cosecha con quitosano y la cosecha con centrifugación.

La cosecha de biomasa con quitosano representa una alternativa para la mitigación de gases de efecto invernadero y reducción de energía invertida. Se evaluó la huella de carbono del proceso conforme a los lineamientos de la NMX-AA-174 SCFI-2008, permitiendo cuantificar las emisiones asociadas y compararlas entre sí. La figura 15 muestra los límites de los dos sistemas a analizar.

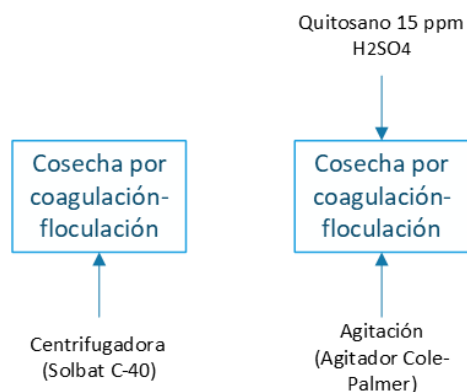


Figura 15. Límites del sistema para el cálculo de huella de carbono

El proceso de extracción de lípidos se realizó con la biomasa seca. Las muestras de biomasa obtenidas de las pruebas de jarras marcadas en la figura 14 se secaron a 60 °C por 24 horas.

En la Figura 16 se muestra la metodología realizada en las extracciones con el método descrito por (Halim *et al.*, 2011).

Siguiendo la metodología de Halim (2011), en un matraz bola se añadió la biomasa y solvente en una relación 1g de biomasa seca por 75mL de solvente en mezcla 3:2 v/v hexano: isopropanol. Se dejó en agitación por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente hizo pasar por un filtro Whatman y se filtró un excedente de agua y hexano, ambos en una proporción de 1 g de biomasa por 10 mL de cada uno. Se separaron las fases por medio de centrifugación a 3,500 rpm por 20 min. Las fases se separaron y la fase superior se secó a 60°C por 24 h en un matraz bola y se cuantificó el peso de este (Halim *et al.*, 2011). Una vez obtenidas las muestras de lípidos se realizan análisis en FT-IR y Análisis termogravimétrico (TGA). Como resultado de esta etapa se obtuvieron 3 muestras: Lípidos resultantes de la coagulación de biomasa a pH 4 (L_4), lípidos resultantes de la coagulación de biomasa a pH 10 (L_10) y lípidos resultantes de la coagulación de biomasa centrifugada (L_CC).

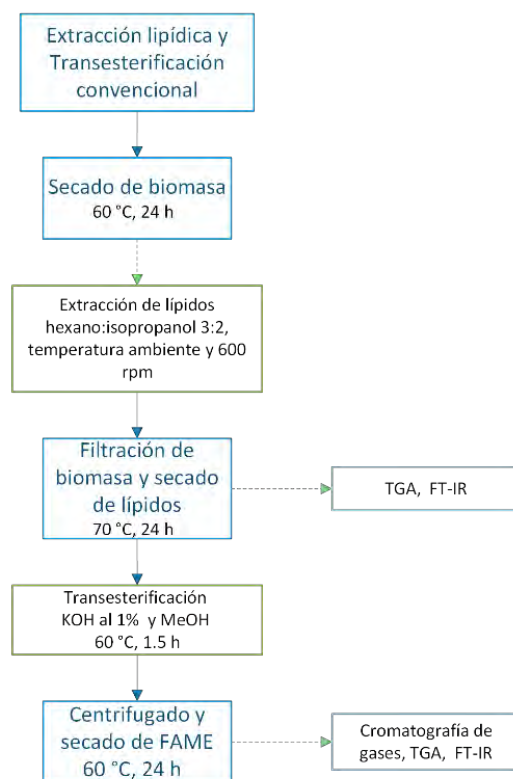


Figura 16. Diseño de experimentos etapa de extracción lipídica y transesterificación convencional.

El rendimiento de extracción de lípidos se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de lípidos (\%)} = \left(\frac{m_{\text{aceite extraído}}}{m_{\text{biomasa seca}}} \right) \times 100$$

Dónde:

$m_{\text{aceite extraído}}$: masa del aceite extraído en el proceso (g)

$m_{\text{biomasa seca}}$: masa de la biomasa en la entrada del proceso (g)

Para la etapa de transesterificación se añadió al matraz bola, con los lípidos contenidos, una solución de KOH con MeOH, en una relación de KOH al 1% respecto al triglicérido. La mezcla se mantuvo a 60 °C durante 1.5 h y conectado a un refrigerante de tubos concéntricos para asegurar la contención de la posible evaporación del MeOH como se muestra en la figura 17.

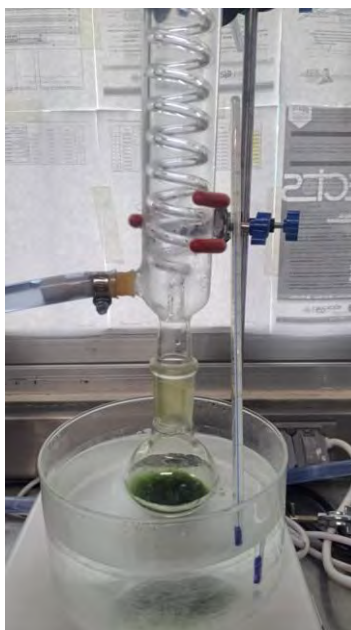


Figura 17. Sistema de reacción de transesterificación

Al finalizar la reacción se separaron centrifugándolas a 4,000 rpm por 30min. La fase superior se dejó secando a 60°C por 24 h. Una vez obtenidas las muestras de FAME se realizó análisis en FT-IR, TGA y cromatografía de gases para determinar el contenido de esteres metílicos y su perfil. Como resultado de esta etapa se obtuvieron 3 muestras: FAMES resultantes de la coagulación de biomasa a pH 4 (F_4), FAMES resultantes de la coagulación

de biomasa a pH 10 (F_10) y FAMEs resultantes de la coagulación de biomasa centrifugada (F_CC).

Para la preparación de la solución de catalizador y alcohol, se pesó en un vaso de precipitado NaOH y se agregó metanol. Se llevó a una parrilla para agitación por 30 min a 700 rpm y se mantuvo tapado hasta tener la dispersión de KOH en el MeOH.

La productividad volumétrica se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Productividad\ volumétrica\ (g\ L^{-1}\ d^{-1}) = \left(\frac{m_{FAME}}{V_{reactor} \times t_{cultivo}} \right) \times 100$$

Dónde:

m_{FAME} : masa de los FAMEs obtenidos (g)

$V_{reactor}$: volumen de operación del reactor (raceway) (L)

$t_{cultivo}$: tiempo del crecimiento del cultivo (d)

Los Análisis Termogravimétricos (TGA) se realizaron bajo una atmósfera inerte (Nitrógeno) de 35°C a 650 °C, posteriormente se inyectó aire para simular la combustión hasta los 800 °C, a una tasa de calentamiento de 20 °C min⁻¹.

El perfil de ácidos grasos se determinó mediante un cromatógrafo de gases Clarus 580 (Perkin Elmer) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), obtenidos por transesterificación básica, se diluyeron en hexano grado HPLC (1:100 v/v) antes de su análisis. La separación se llevó a cabo en una columna capilar Elite-5 (Perkin Elmer) utilizando nitrógeno como gas acarreador (30 psi). El programa térmico del horno inició a 100 °C (3 min), con una rampa de 20 °C min⁻¹ hasta alcanzar 280 °C, temperatura que se mantuvo por 8 min. Las temperaturas del inyector y detector se fijaron en 260 °C. La cuantificación de los analitos se realizó mediante interpolación con curvas de calibración externa.

Para efectos de la trazabilidad de las muestra y mejor comprensión se incluye la tabla 10 con las abreviaturas de cada muestra y su significado.

Tabla 10. Resumen de abreviaturas de las distintas muestras.

Etapa 1		Etapa 3	
C. 1	Cinética 1 realizada al cultivo de 0.5 L	CC	Prueba de escalamiento con cosecha con centrifugación
C.3	Cinética 3 realizada al cultivo en raceway	L_10	Lípidos resultado de la cosecha con coagulación a pH 10
C.8	Cinética 8 realizada al cultivo en raceway	L_4	Lípidos resultado de la cosecha con coagulación a pH 4
		L_CC	Lípidos resultado de la cosecha con centrifugación
		F_CC	FAMEs resultado de la cosecha con centrifugación
		F_10	FAMEs resultado de la cosecha con coagulación a pH 10
		F_4	FAMEs resultado de la cosecha con coagulación a pH 4

Capítulo 4. Resultados y análisis.

4.1. ETAPA 1. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Las cinéticas de crecimiento se muestran en las figuras 17, 18 y 19 para las para tres condiciones distintas de cultivo de *Haematococcus pluvialis*: cultivo en fotobiorreactor de 0.5 L (C.1_0.5 L) y los dos cultivos en raceway (C.3_Raceway y C.8_Raceway) con la metodología tal como se describe en la sección 3.1.

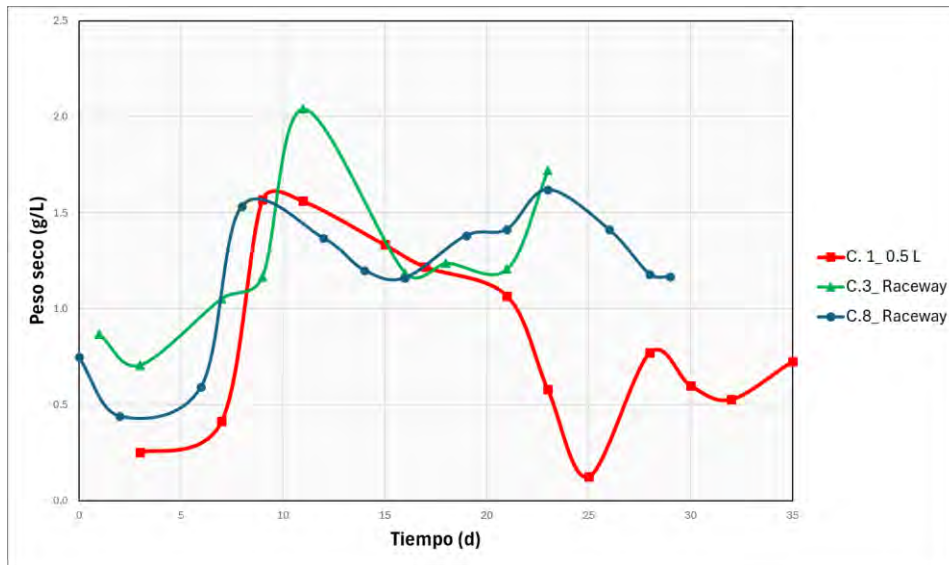


Figura 18. Peso seco vs Tiempo de cinética de C.1, C.3 y C.8.

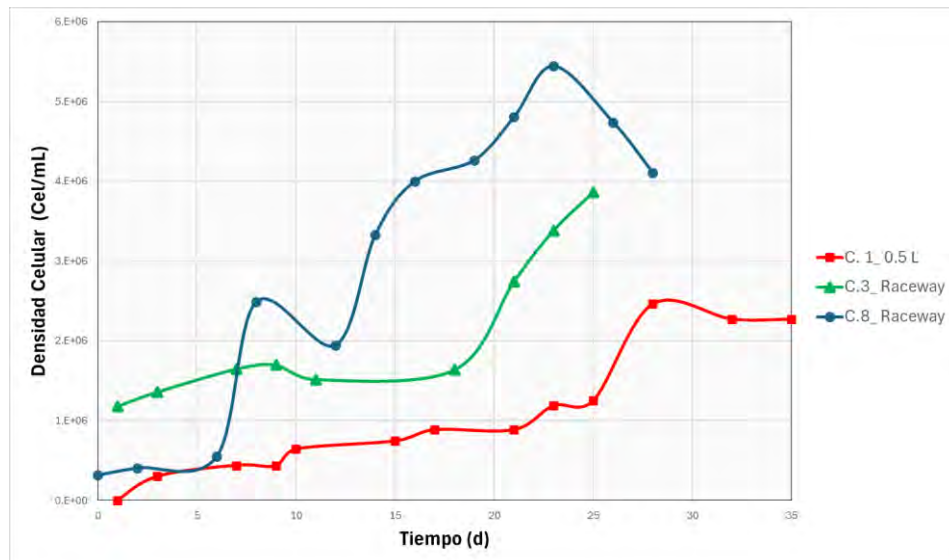


Figura 19. Cinéticas de la densidad celular ($\text{cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) para C.1, C.3 y C.8

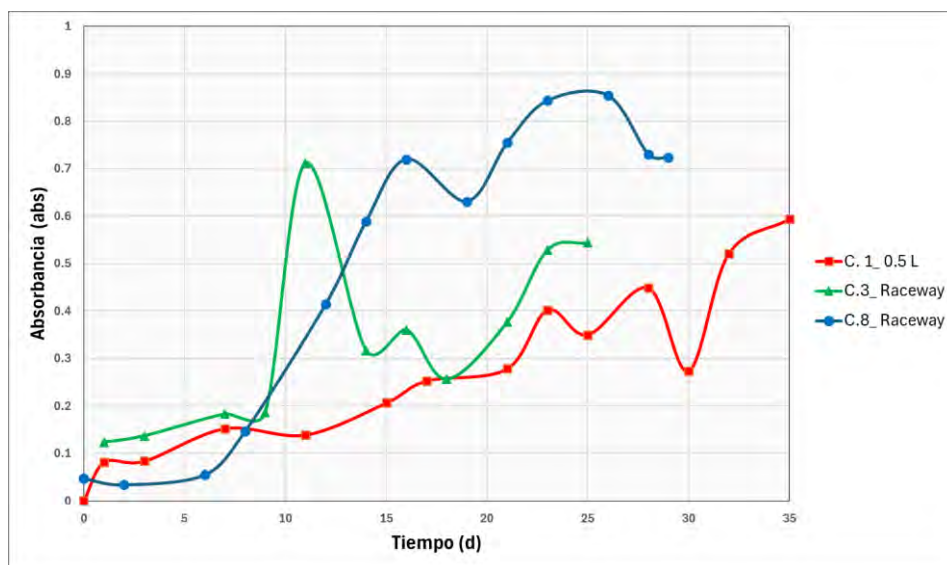


Figura 20. Cinética de densidad óptica para C.1, C.3 y C.8.

Tabla 11. Tasas de crecimiento específicas

Cultivo	Tasa de crecimiento específica (μ)	Referencia
C.1. <i>Haematococcus p.</i>	$\mu = 0.0788 d^{-1}$	Este estudio
C.3. <i>Haematococcus p.</i>	$\mu = 0.0494 d^{-1}$	Este estudio
C.8. <i>Haematococcus p.</i>	$\mu = 0.1239 d^{-1}$	Este estudio
Control <i>Haematococcus p.</i>	$\mu = 0.19 d^{-1}$	(Damiani <i>et al.</i> , 2010)

Tabla 12. Resultados de peso seco, densidad óptica y densidad celular.

Cinética	Peso seco máx. ($g L^{-1}$)	Absorbancia máx. (abs)	Densidad celular máx. (cel mL^{-1})
C.1	1.56	0.593	2.46×10^6
C.3	2.04	0.711	3.86×10^6
C.8	1.62	0.854	5.45×10^6

En la tabla 12 se resumen los resultados obtenidos de las tres cinéticas. Se obtuvo un máximo en densidad celular de 5.45×10^6 cel mL^{-1} y una producción de biomasa seca de $1.62 g L^{-1}$ el día 23. La cinética C.8 presentó el mayor valor de absorbancia, alcanzando aproximadamente 0.854 abs alrededor del día 26.

Se determinó la tasa de crecimiento específica para los tres cultivos analizados (tabla 11), la tasa más alta se obtuvo en la C.8. ($\mu = 0.1239 d^{-1}$) lo cual indica que en aproximadamente 8 días es el tiempo de duplicación celular, comparándola con Damiani *et al.*, (2010) donde se reportó la tasa de crecimiento celular para *Haematococcus pluvialis* de $\mu = 0.19 d^{-1}$ y el tiempo de duplicación similar (5 días) (Damiani *et al.*, 2010).

El comportamiento de las curvas permitió identificar que las cinéticas alcanzaron su fase exponencial entre los días 20 y 25 en el caso del cultivo en raceway. Este tipo cultivo (C.3 y C.8) mostró una mayor acumulación de biomasa en comparación con el fotobiorreactor (C.1).

El cultivo C.8 es el que tuvo mejores resultados los cuales, son clave para definir el mejor momento de cosecha y evaluar el potencial de escalamiento del cultivo. Este comportamiento sugiere condiciones óptimas para la cepa en este método de cultivo, debido a una mejor exposición a la luz, mayor volumen que favorece la distribución de nutrientes, una agitación efectiva, la reflectancia debida al color del estanque y el flujo que favorece la distribución de nutrientes y biomasa (Chisti, 2007).

Finalmente, la coincidencia en las tendencias generales de los tres parámetros (picos y caídas en tiempos similares) valida la confiabilidad de los datos obtenidos, teniendo en cuenta las fallas del sistema antes mencionadas. La comparación muestra que tanto la densidad óptica como el conteo celular son buenos indicadores del crecimiento, pero el peso seco aporta información adicional sobre la acumulación de biomasa total, lo que es relevante para procesos posteriores del estudio (cosecha y extracción de lípidos).

4.1. ETAPA 2. COSECHA DE M.A.

4.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN Y PRUEBA DE JARRAS

Para la etapa 2 se obtuvieron resultados de la prueba de jarras aplicando el diseño experimental mencionado en la metodología. En la tabla 13 se observan las eficiencias de la floculación a los 10 y 30 min de sedimentación.

Se alcanzaron eficiencias superiores al 90% bajo ciertas combinaciones de factores, siendo estas comparables e incluso superiores a las logradas mediante centrifugación, utilizada como referencia.

Tabla 13. Resultados obtenidos de la prueba de jarras

Experimento	Quitosano	pH	Velocidad de agitación	FE 10 min	FE 30 min
#	(mg L ⁻¹)		(rpm)	(%)	(%)
1	5	4	70	70.62±0.59	72.12±3.2
2	15	4	70	75.41±8.53	84.43±2.8
3	5	10	70	75.10±7.34	83.38±2.2
4	15	10	70	87.65±5.30	90.69±6.1
5	10	7	70	83.10±10.11	74.03±5.09
6	10	7	70	71.27±2.82	72.06±1.7
7	5	7	20	72.21±2.97	78.11±4.5
8	15	7	20	68.30±1.60	75.83±2.4
9	10	4	20	65.92±11.42	76.36±4.6
10	10	10	20	73.42±4.61	95.13±3.5
11	5	7	120	89.77±5.95	83.96±3.3
12	15	7	120	75.80±5.59	89.60±5.0
13	10	4	120	89.46±3.96	81.38±5.5
14	10	10	120	82.93±1.90	84.71±4.2
15	10	7	70	78.77±7.51	78.63±2.9
CC					91.85±0.94

Para el tiempo de sedimentación de 10 min, las mayores eficiencias se obtuvieron en el experimento 11 (89.77%) y 13 (89.46%), con pH 7 y 4, agitación alta (120 rpm), y concentraciones de quitosano de 5 y 10 mg L⁻¹ respectivamente.

Las menores eficiencias se observaron en el experimento 9 (65.92%), con baja agitación (20 rpm), pH ácido (4) y 10 mg L⁻¹ de quitosano.

Esto sugiere que la agitación intensa favorece una floculación más rápida, Ahmad *et al.* (2011), demostró el efecto que tiene la velocidad de agitación y determinó que a velocidades altas (más de 150 rpm) se re-estabilizan las células, causando rompimientos en los flóculos formados, en caso contrario, las velocidades bajas no ayudan a que el quitosano sea absorbido en la superficie de las células de las microalgas (Ahmad *et al.*, 2011a).

Por otro lado, para el tiempo de sedimentación de 30 min, el valor máximo se obtuvo en el experimento 10 (95.13%), con pH 10, agitación baja (20 rpm) y 10 mg L⁻¹ de quitosano, superando la eficiencia obtenida en la centrifugación (91.85%).

En contraste, las eficiencias más bajas a 30 minutos se registraron en las corridas 6 (72.06 %) y 1 (72.12 %), ambas con condiciones intermedias de agitación y condiciones distintas de pH y coagulante. Tal como reportó Ahmad *et al.* (2011), la concentración de quitosano que resulto más favorable para su estudio fue de 10 ppm y velocidad de mezclado de 150 rpm (Ahmad *et al.*, 2011).

El mejor resultado se obtuvo bajo la condición de 10 mg L⁻¹ de quitosano, pH 10 y agitación a 20 rpm, alcanzando una eficiencia de remoción de 95.13 %, lo cual supera la eficiencia del control por centrifugación (91.85 %).

En la etapa de escalamiento (sección 4.3.1), la ER se incrementó hasta 99.73 % a pH 4, lo que evidencia la robustez del proceso al aumentar el volumen de operación. Estos resultados se encuentran en el rango superior de los reportados en el estado del arte. Ahmad *et al.* (2011) reportaron eficiencias cercanas al 99 % para *Chlorella sp.* a pH neutro empleando quitosano, mientras que Rasweefali *et al.* (2024) obtuvieron 94.7 % para *Scenedesmus sp.* con 10 mg L⁻¹ de quitosano. De manera similar, Suastes-Rivas *et al.* (2024) reportaron eficiencias próximas al 98 % a pH ligeramente alcalino y bajas velocidades de agitación. En comparación, los valores obtenidos en este estudio son equivalentes o superiores,

considerando además que se trata de *H. pluvialis*, una especie menos estudiada desde el punto de vista de cosecha con quitosano.

Para el RSM y su análisis estadístico se tomaron los resultados obtenidos únicamente a los 30 min de sedimentación debido a las altas eficiencias de recuperación de biomasa y a que los flóculos observados en estas condiciones fueron más estables, pesados y no tendían a la resuspensión.

En la tabla 14 se muestra el resumen del análisis estadístico que arrojó el software Design expert® para las pruebas de jarras realizadas para 30 min de sedimentación, usando el modelo cuadrático, el cual dio los mejores resultados en cuanto a ajuste y en la tabla 15 se presentan los resultados del análisis ANOVA.

Tabla 14. Estadísticas de Ajuste para modelo cuadrático

Std. Dev.	1.33	R ²	0.9867
Mean	82.40	Ajustada R ²	0.9628
C.V. %	1.62	Predicha R ²	0.8213
		Adeq precisión	19.9819

Tabla 15. ANOVA para el modelo cuadrático

	Suma de cuadrados	df	Cuadrados medios	Valor F	Valor P	
Modelo cuadrático	659.96	9	73.33	41.27	0.0004	Significativo
A-Quitosano (mg L⁻¹)	158.24	1	158.24	89.06	0.0002	
B-pH	138.61	1	138.61	78.01	0.0003	
C-Velocidad (rpm)	8.57	1	8.57	4.82	0.0795	
AB	6.25	1	6.25	3.52	0.1196	
AC	0.1600	1	0.1600	0.0900	0.7762	
BC	118.37	1	118.37	66.62	0.0004	
A²	31.75	1	31.75	17.87	0.0083	
B²	83.91	1	83.91	47.23	0.0010	
C²	144.33	1	144.33	81.23	0.0003	
Residuales	8.88	5	1.78			
Falta de ajuste	7.24	3	2.41	2.93	0.2647	No significativo
Error puro	1.65	2	0.8234			
Cor Total	668.84	14				

El análisis ANOVA arroja resultados favorables para un modelo cuadrático donde se observa el valor de correlación alto de 0.9867 y la R^2 predicha es de 0.8213. La R^2 predicha es un poco más baja, pero sigue siendo aceptable y este valor indica que el modelo no solo ajusta bien los datos experimentales, sino que también tiene capacidad predictiva razonable. La diferencia entre R^2 ajustada y R^2 predicho no es mayor que 0.2 por lo que es un resultado deseable. La precisión Adeq fue de 19.9819 nos indica que el modelo tiene una buena señal-ruido y es confiable para el análisis del diseño en general. El valor de CV (1.62) es baja e indica que la dispersión de los residuos es mínima y los resultados son consistentes.

La significancia del modelo se mide con el F-value y P-value los cuales fueron de 41.27 y 0.0004, se espera tener menos 0.05 de P-value por lo que el modelo es altamente significativo y se confirma que el modelo cuadrático describe la variable respuesta (ER). Los términos del modelo A y B son muy significativos ($p < 0.0002$), mientras de C no es significativo ($p\text{-value} = 0.0795$). Por otro lado, las interacciones entre los factores son significativos para BC ($p = 0.0004$) y no significativos para AB ($p = 0.1196$) y AC ($p = 0.7762$), lo que evidencia la dependencia cruzada entre la química del medio y las condiciones hidrodinámicas.

En el caso de los términos cuadráticos, A^2 , no es significativo y B^2 y C^2 si lo son por ser menores de 0.01. Esto indica que el modelo necesita los términos cuadráticos para describir la curvatura de la superficie de respuesta.

En cuanto al ajuste del modelo, los residuales (8.88) muestran que el error es pequeño comparado al total (668.84). La falta de ajuste con $F = 2.93$ y $p = 0.2647$ muestra que no es significativo, por lo tanto, no hay evidencia estadística de que el modelo sea inadecuado y el modelo se ajusta bien y cualquier desviación se debe al azar (ruido experimental).

El error puro de 0.8234 indica que las réplicas fueron consistentes.

El modelo resultante describe de forma adecuada la complejidad del sistema, mostrando una relación no lineal entre los factores y la respuesta. Las ecuaciones del modelo permiten predecir la eficiencia de remoción con un error experimental menor al 5 %, confirmando la validez estadística del ajuste y su utilidad para optimizar el proceso.

En la figura 20, 21, 22 y 23 se muestra las gráficas de superficie de respuesta obtenidas por medio del análisis del diseño experimental, realizadas con los resultados obtenidos en la prueba de jarras. Estas mismas representan las superficies de respuesta tridimensionales y sus contornos generados por el modelo cuadrático ajustado a los datos experimentales del proceso de coagulación-floculación con quitosano a 30 min de sedimentación. Las gráficas permiten visualizar la interacción entre las variables independientes (concentración de quitosano, pH y velocidad de agitación) y su efecto combinado sobre la ER. En conjunto, las gráficas confirman la no linealidad del sistema y la existencia de zonas múltiples de máxima eficiencia, comportamiento característico de procesos gobernados por más de un mecanismo fisicoquímico de desestabilización.

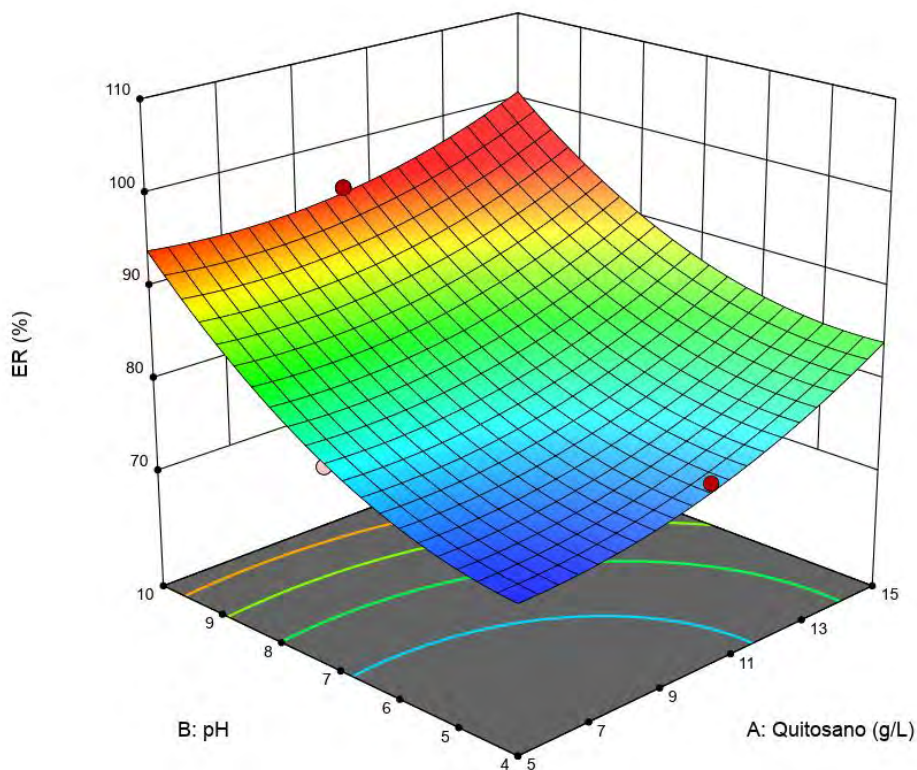


Figura 21. Graficas de contorno de FE a los 30 min. B vs A, constante C=20

En la figura 21 se muestra el efecto de los factores A y B en la Eficiencia de la remoción, manteniendo el factor C (velocidad de agitación) en 20. Se observan eficiencias mayores al 95% a pH bajo y a concentraciones de quitosano altas.

Mientras que vemos un efecto negativo en la ER con pH's y concentraciones de quitosano bajas.

Se observa un incremento de la eficiencia conforme aumentan tanto el pH como la concentración de quitosano, alcanzándose valores superiores al 95 %. Este patrón sugiere un efecto sinérgico entre la mayor disponibilidad de grupos amino activos del quitosano y la reducción de la repulsión electrostática entre partículas bajo condiciones alcalinas.

A pH alto (10), el quitosano experimenta una disminución en su carga positiva, lo cual propicia la adsorción por puenteo polimérico y la formación de flóculos grandes y porosos que facilitan la sedimentación (Ali *et al.*, 2025b; Renault *et al.*, 2009). En contraste, en condiciones ácidas (pH 4) y con baja concentración de coagulante, la eficiencia cae por debajo del 80 %, lo que indica que, aunque la carga positiva del quitosano es máxima, la cantidad de polímero disponible puede ser insuficiente para cubrir la superficie de las partículas y generar uniones estables (Coleman *et al.*, 2024).

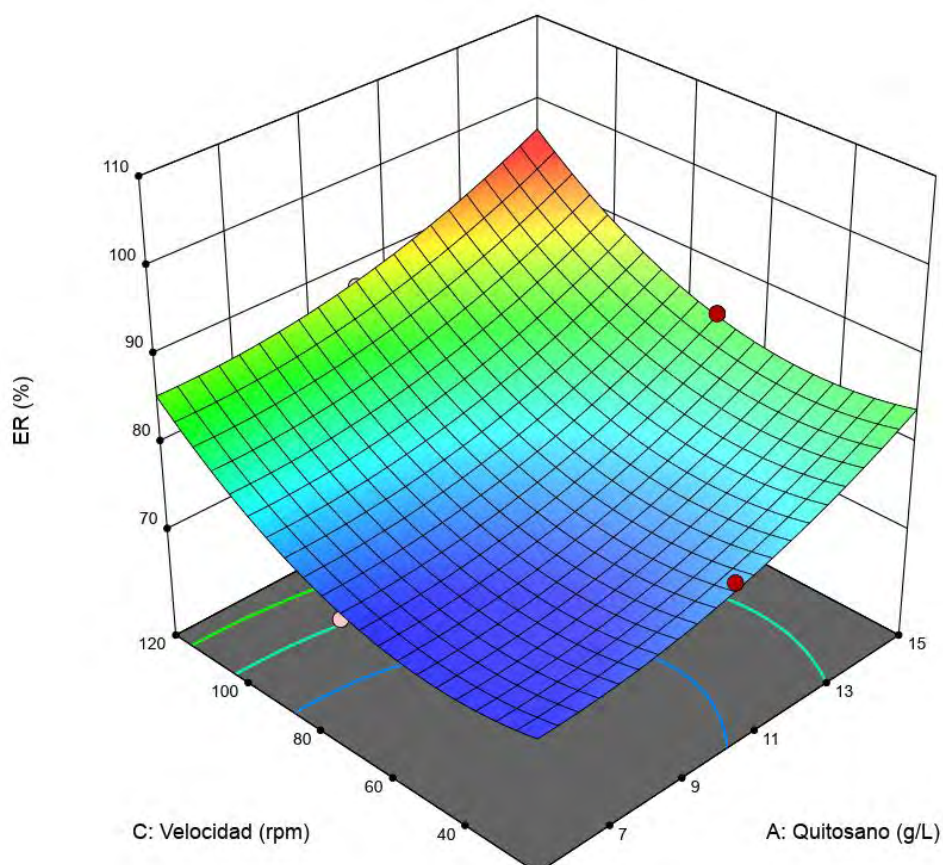


Figura 22. Graficas de contorno de FE a los 30 min. C vs A, constante B=4.

En la figura 22 se muestra el efecto de los factores A y C en la ER, manteniendo el factor B (pH) en 4. muestra un incremento de la eficiencia con el aumento de la velocidad de agitación y la concentración de quitosano. Se observan eficiencias cercanas al 90 % en la región de mayor velocidad (≥ 120 rpm) y dosis altas (≥ 15 mg L⁻¹). Esto sugiere que, en medios ácidos, la agitación vigorosa favorece la dispersión homogénea del polímero y aumenta la frecuencia de colisiones entre partículas y coagulante, permitiendo una neutralización más completa de las cargas negativas celulares (Ahmad *et al.*, 2011).

No obstante, velocidades excesivas pueden inducir ruptura parcial de flóculos si se prolonga el tiempo de agitación, debido a la fragilidad de las uniones electrostáticas formadas en esta etapa (Miranda *et al.*, 2020). El modelo estadístico respalda este comportamiento mediante el término cuadrático significativo (C², $p = 0.0003$), que indica una curvatura descendente a altas velocidades, reflejando la existencia de un punto óptimo de cizalla.

La figura 23 también muestra el efecto de los mismos factores únicamente se varió el factor B (pH) de 10. Observamos un comportamiento distinto, a Velocidades bajas y concentraciones de coagulante altas, obtenemos las ER más altas.

Por lo tanto, se puede decir que a velocidades en los extremos (120 y 20 rpm) podemos obtener ER deseables mayores de 90%. Este efecto se debe al efecto de puenteo en velocidades bajas y de neutralización de carga a velocidades altas y pH de 4, debido a la protonación de los grupos amino.

En la figura 23, donde el pH se mantuvo en 10, el comportamiento es inverso: las mayores eficiencias (> 90 %) se logran con velocidades bajas (≈ 20 rpm) y altas concentraciones de quitosano. En este rango de pH, el mecanismo predominante cambia hacia puenteo polimérico y barrido o atrapamiento (“sweep flocculation”), procesos que requieren bajas tasas de cizalla para evitar la ruptura de los flóculos (Renault *et al.*, 2009). La agitación suave permite que las cadenas del polímero se extiendan y unan partículas adyacentes sin ser interrumpidas por tensiones mecánicas, favoreciendo la formación de flóculos voluminosos y de alta porosidad (Ali *et al.*, 2025b). Jonas, *et al.* (2018), menciona que a pH alcalinos la precipitación se da gracias a la desprotonación parcial del quitosano y a la formación de una red que permite el mecanismo de barrido de las partículas.

Este efecto explica por qué el experimento 10 (pH 10, 10 mg L⁻¹, 20 rpm) alcanzó la eficiencia máxima global (95.13 %). Además, confirma la interacción significativa entre el pH y la velocidad (BC, p = 0.0004) detectada por el ANOVA: a medida que el pH aumenta, la velocidad óptima de agitación disminuye para evitar la desintegración de flóculos.

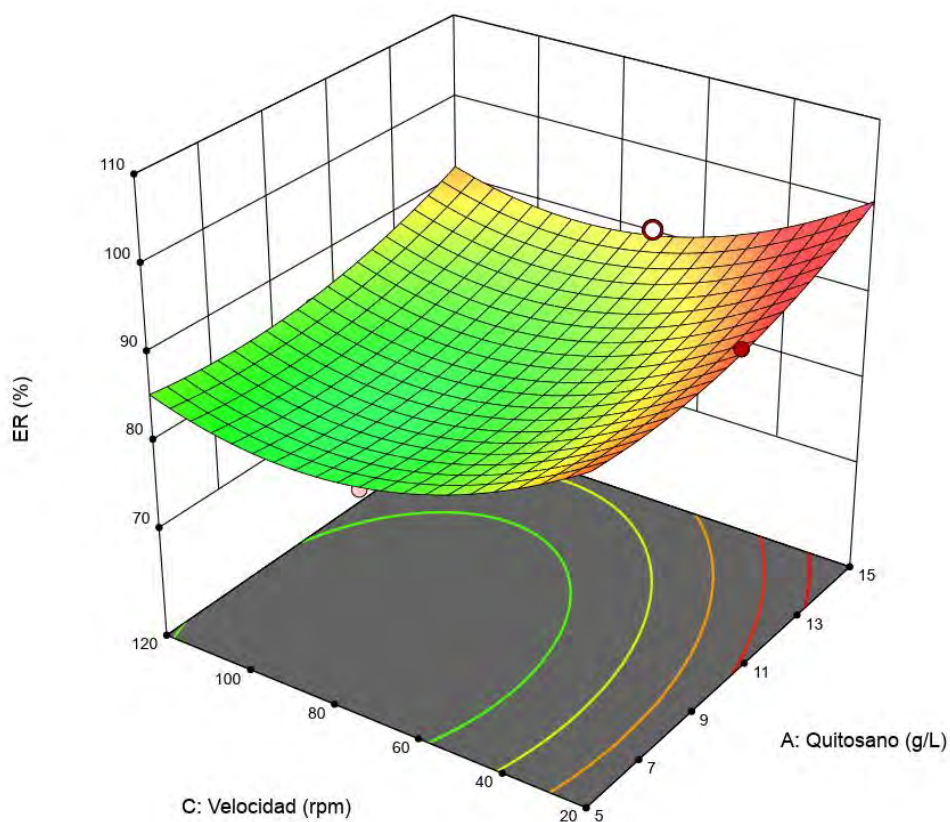


Figura 23. Graficas de contorno de FE a los 30 min. C vs A, constante B=10

La figura 24 obtenida a concentración fija de quitosano (15 mg L⁻¹), muestra un patrón con punto mínimo, con dos zonas de alta eficiencia (> 90 %):

- A pH bajo y alta velocidad de agitación (120 rpm), y
- A pH alto y baja velocidad (20 rpm).

Este comportamiento dual refleja la coexistencia de dos mecanismos dominantes de floculación dependientes del pH y de la tasa de mezcla. En el extremo ácido, la agitación intensa favorece la neutralización rápida de cargas y colisión de partículas, mientras que, en

el extremo alcalino, la agitación suave preserva las uniones por puenteo y precipitación. Tal patrón ha sido reportado en sistemas coloidales complejos, donde el cambio de pH modifica tanto la especiación superficial del polímero como la dinámica de agregación (Ali *et al.*, 2025b; Rasweefali *et al.*, 2024a; Renault *et al.*, 2009).

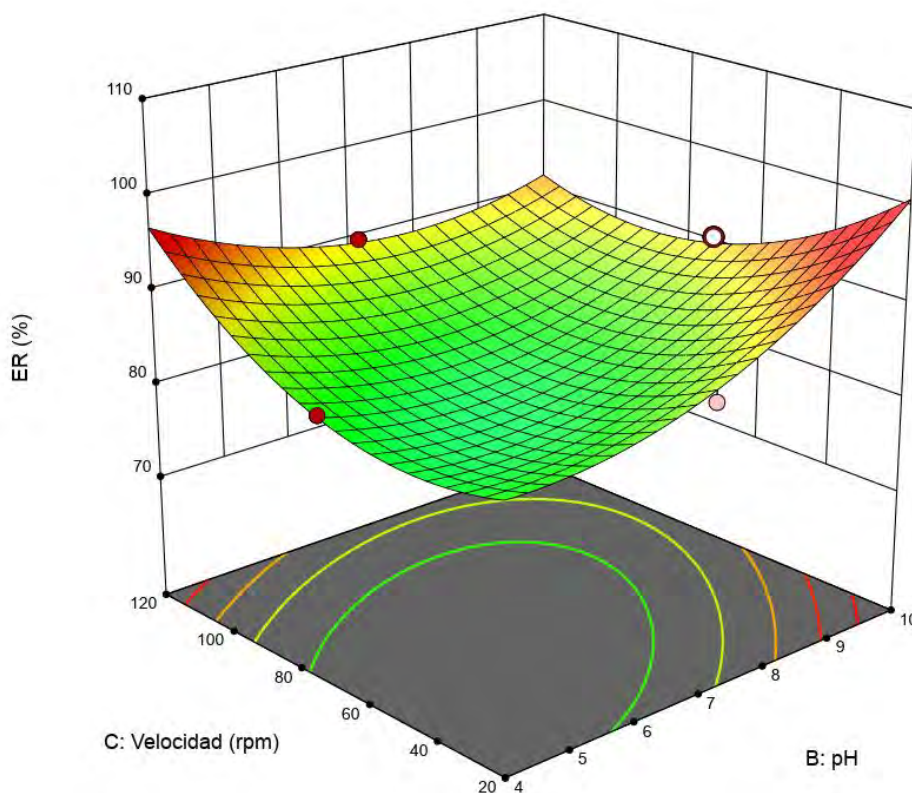


Figura 24. Graficas de contorno de FE a los 30 min. C vs B, constante A=15

Desde el punto de vista estadístico, este comportamiento explica la significancia de los términos cuadráticos B^2 y C^2 , así como la fuerte interacción BC observada en el modelo, responsables de la curvatura bidimensional característica de una superficie de respuesta no monótona, quiere decir que no depende de un solo parámetro.

En conjunto, las gráficas confirman que el proceso de coagulación-floculación con quitosano no sigue una relación lineal simple entre los factores operativos y la respuesta, sino que está regido por mecanismos sinérgicos y competitivos. A pH bajo y velocidades de agitación altas predomina la neutralización de cargas, mientras que a pH alto y velocidades de agitación

bajas domina el puenteo polimérico y la floculación por barrido. Este fenómeno genera dos zonas de operación igualmente efectivas, lo cual ofrece flexibilidad operativa según las condiciones del sistema a tratar. Este comportamiento concuerda con Chua *et al.* (2020), quienes señalan que la eficiencia de floculación depende de la combinación entre la protonación del quitosano y las condiciones hidrodinámicas. A diferencia de estudios que reportan un único mecanismo dominante, los resultados experimentales evidencian la coexistencia de neutralización de carga (alta agitación) y puenteo polimérico (baja agitación), lo que explica la amplia región operativa con eficiencias superiores al 95 %.

El mecanismo de cosecha observado en este estudio se fundamenta en la naturaleza polielectrolítica del quitosano. Según Renault *et al.*, (2009) la eficacia del proceso depende de la protonación de los grupos amino en medios ácidos, lo que otorga al polímero una carga neta positiva. Esta carga permite la neutralización de las cargas negativas superficiales de *H. pluvialis* y, como sugieren Ahmad *et al.* (2019), facilita la formación de 'parches de carga' y 'puentes poliméricos' que incrementan el tamaño y la velocidad de sedimentación de los flóculos (Renault *et al.*, 2009; Ahmad *et al.*, 2019).

El modelo cuadrático obtenido mediante RSM describe adecuadamente esta complejidad y permite identificar regiones de operación óptima con alta eficiencia (> 90 %) y mínima variabilidad experimental. Este resultado respalda la robustez del quitosano como biocoagulante multifuncional, capaz de actuar eficazmente en rangos amplios de pH y condiciones hidrodinámicas, lo que lo posiciona como una alternativa sostenible y de alto rendimiento frente a coagulantes convencionales.

4.3. ETAPA 3. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS Y TRANSESTERIFICACIÓN

4.3.1. ESCALAMIENTO DE COAGULACIÓN

Los resultados obtenidos en la primera subetapa que corresponde al escalamiento de la coagulación se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Resultados del escalamiento de coagulación.

Prueba	Quitosano (mg L ⁻¹)	pH	Velocidad de agitación (rpm)	Eficiencia de recuperación (%)	Biomasa seca recuperada (g)
1	15	10	70	98.88	2.39
2	15	4	70	99.72	2.45
CC	-	-	-	91.85	2.00

Podemos observar que tenemos eficiencias mayores a las que se obtuvieron en la etapa 2 mostradas en la tabla 13. Para la prueba a pH 10 y 4, se tenía una ER de 90.69 % y 84.43 % respectivamente y en el escalamiento estas aumentaron a 98.88 % y de 99.7264 %.

El pH alcalino mostró mejor desempeño en la prueba a 1 L, ya que el rendimiento del proceso de separación con quitosano no depende solo del pH, sino de la interacción entre volumen, hidrodinámica, agitación, distribución de energía, tiempo de mezcla, concentración celular y la propia cinética de unión del quitosano (Chua *et al.*, 2020).

En volúmenes pequeños la energía de agitación se distribuye de manera más homogénea y el quitosano se dispersa mejor, incluso cuando está menos protonado en condiciones alcalinas. Esto puede generar flóculos más compactos y sedimentación más rápida. Además, a pequeña escala la estructura celular sufre menos cizallamiento y puede mantener mayor integridad lipídica, lo que favorece su posterior extracción. En contraste, a mayor volumen o con diferente geometría del sistema, la mezcla no es igual de eficiente: bajo pH ácido el quitosano sí alcanza mayor grado de protonación y logra una floculación más robusta, mientras que a pH alcalino puede perder eficiencia debido a dispersión insuficiente o formación de flóculos débiles.

4.3.2. CÁLCULO DE HUELLAS DE CARBONO

Los resultados obtenidos para las huellas de carbono de las etapas de cosecha con quitosano y centrifugación de la etapa de escalamiento se muestran en la tabla 17. Las memorias de cálculo se encuentran en el Anexo 1.

Tabla 17. Resultados de huellas de carbono

Método de cosecha	Energía (kg CO₂ eq kg⁻¹ biomasa seca)	Insumos (kg CO₂ eq kg⁻¹ biomasa seca)	Total (kg CO₂-eq kg⁻¹ biomasa seca)
Coagulación con quitosano	35.1439	0.5873	35.7311
Centrifugación	1,716.2615	0	1,716.2615

La evaluación de la huella de carbono de la etapa de cosecha evidenció diferencias sustanciales entre los métodos analizados. La coagulación con quitosano presentó un impacto total de 35.73 kg CO₂ eq kg⁻¹ de biomasa seca. En contraste, la centrifugación mostró un impacto mayor, alcanzando 1716.26 CO₂ eq kg⁻¹ de biomasa seca resultado únicamente de la energía eléctrica invertida en el proceso. Estos resultados indican que el uso de la coagulación con quitosano reduce la huella de carbono 48 veces en comparación con el uso de la centrifugación.

4.3.3. EXTRACCIÓN LIPÍDICA

La tabla 18 presenta los resultados de las pruebas de extracción de lípidos a partir de biomasa microalgal sometida a diferentes condiciones de coagulación con quitosano.

Tabla 18. Resultados extracción de lípidos

Prueba	Quitosano (mg·L⁻¹)	pH	Velocidad de agitación (rpm)	Biomasa seca (g)	Lípidos extraídos (g)	Rendimiento de extracción de lípidos (%)	Productividad lipídica (mg·L⁻¹·d⁻¹)
L_10	15	10	70	2.0027	0.1552	7.7495	0.5173

L_4	15	4	70	2.0031	0.2309	11.5271	0.7696
L_CC	-	-	-	2.0020	0.1911	9.5454	0.6370

La biomasa seca obtenida se mantiene sin diferencia significativa entre ambas condiciones experimentales (2.39–2.46 g), mientras que la cantidad de lípidos extraídos y el rendimiento de aceite muestran variaciones más sensibles al pH. La prueba a pH 4 logró extraer más lípidos (0.2309 g), con un rendimiento del 11.52 %, superando al pH 10 (7.39 %). La corrida central (CC) muestra un valor intermedio (9.54 %).

Esto sucede ya que el pH ácido favorece la protonación del quitosano, mejorando la eficiencia de floculación, lo que conduce a una mayor recuperación celular y, por tanto, a una mayor disponibilidad de lípidos para su extracción. A pH alcalino, parte de la biomasa puede no agregarse eficientemente o sufrir desestabilización estructural, reduciendo la disponibilidad lipídica. Su importancia radica en que estas variaciones, aunque sutiles en biomasa, impactan directamente la productividad lipídica y la eficiencia global del proceso.

Zhu *et al.*, 2018 demostró con *Chlorella vulgaris* que la extracción de lípidos con quitosano permitió obtener el 32.9 % de lípidos y aumentó ligeramente en comparación con la coagulación con sulfato de aluminio (28.3%) y centrifugación (32.7%), lo que sugiere que el quitosano no interfiere negativamente con la recuperación lipídica (Zhu *et al.*, 2018).

Por lo tanto, optimizar pH y condiciones de floculación es esencial para maximizar la extracción de lípidos y mejorar la viabilidad económica del biocombustible obtenido.

En cuanto a la productividad lipídica se pueden comparar los resultados con los mostrados en la tabla 2, el rendimiento obtenido en este estudio (11.52 %) se compara con lo reportado para *Haematococcus pluvialis* (15.61 %), considerando que se trata de rendimiento de extracción y no de contenido lipídico total como lo reportado en la tabla 2 (Damiani *et al.*, 2010; Karpagam *et al.*, 2015; Mata *et al.*, 2010). No obstante, la productividad lipídica obtenida (0.51–0.76 mg·L⁻¹·d⁻¹) fue considerablemente menor a los valores típicos reportados (10.3–53.9 mg·L⁻¹·d⁻¹), lo cual se atribuye a la ausencia de estrés en el cultivo y a la naturaleza intrínseca de la cepa, que solo incrementa significativamente su contenido lipídico bajo condiciones de estrés.

Existen diversos métodos de disrupción de la pared celular empleados para facilitar la extracción de compuestos de interés en microalgas. Algunos ejemplos incluyen la homogenización, ultrasonido, microondas, solventes ácidos o básicos, reacción de Fenton, métodos enzimáticos y CO₂ supercrítico (Kim *et al.*, 2014; Martínez-Guerra *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2015a). Debido a que la composición y estructura de la pared celular varía entre especies, la efectividad de estos pretratamientos también difiere considerablemente.

Por ejemplo, en *Botryococcus sp.*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* se ha demostrado que el método más eficiente para facilitar la extracción lipídica es el uso de microondas (Lee, 2010). De manera complementaria, Avinesh *et al.* (2015) compararon seis técnicas de disrupción celular y observaron que el shock osmótico generó los mayores rendimientos de lípidos: 48.7% para *Schizochytrium sp.* S31 y 29.1% para *Thraustochytrium sp.* AMCQS5-5, frente a 21% y 10% obtenidos en los controles sin pretratamiento (Byreddy, 2015). Estos resultados evidencian que los pretratamientos pueden incrementar significativamente el rendimiento lipídico, y que tales diferencias dependen fuertemente de la cepa y de las características de su pared celular (Gupta, 2013).

En el presente trabajo no se aplicó un pretratamiento físico o mecánico específico; sin embargo, el uso de solventes orgánicos polares y no polares (como la mezcla hexano:isopropanol) puede actuar de forma simultánea como agente de extracción y como disruptor de la pared celular. En *Haematococcus pluvialis*, esta acción es especialmente relevante, ya que en la fase verde la pared celular es delgada y flexible, compuesta por una matriz glicoproteica que facilita su ruptura. Por el contrario, durante la etapa roja la microalga desarrolla una pared celular altamente resistente, con un grosor entre 1.8 y 2.2 μm , reforzada por mananos y una capa trilaminar rica en algaenano, un polímero comparable a la esporopolenina que confiere gran rigidez (Hagen *et al.*, 2002).

La incorporación de una etapa de ruptura celular antes de la transesterificación podría mejorar significativamente el proceso, como se ha demostrado en estudios que combinan floculación con métodos físicos o enzimáticos.

La figura 25 muestra los espectros de infrarrojo procesados de las muestra L_CC, L_4 y L_10 y la tabla 19 resume los grupos funcionales vistos en estas muestras.

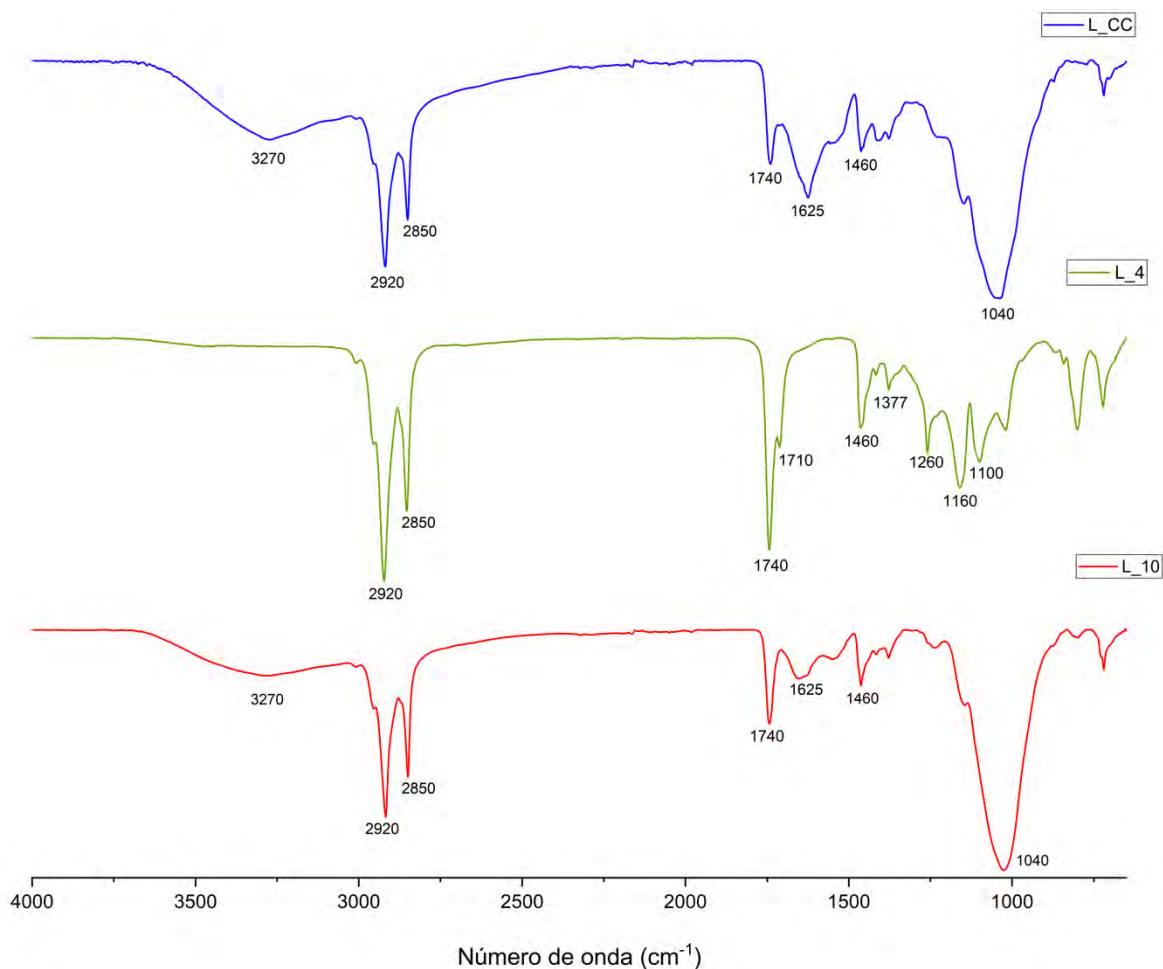


Figura 25. Espectros de FT-IR de lípidos extraídos

Tienen bandas comunes las muestras L_CC y L_10, 3270 cm^{-1} (estiramiento O-H/N-H, típico de grupos hidroxilos o amidas), 2920/2850 cm^{-1} (C-H alifático de cadenas de ácidos grasos), 1740 cm^{-1} (C=O de ésteres o ácidos grasos), 1625 cm^{-1} (C=C o amida) y 1460 cm^{-1} (deformación CH_2). Estas señales indican la presencia de lípidos y proteínas que se conservan cuando la biomasa se centrifuga o se coagula a pH 10.

La señal de 1040 cm^{-1} (-C-O-C de enlaces glucosídicos), se presentan debido al que el medio alcalino promueve la desintegración de la matriz celular, liberando más compuestos como proteínas (glicoproteínas) y carbohidratos (polisacáridos).

Tabla 19. Identificación de grupos funcionales en lípidos.

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3270	N-H/O-H estiramiento (amidas o hidroxilos)
2920	C-H estiramiento (asimétrico, alifático)
2850	C-H estiramiento (simétrico, alifático)
1740	C=O estiramiento (éster o ácido carboxílico)
1625	C=C o C=O (Ac. Carboxílicos o Amida I)
1551	Amida II (N-H doblamiento)
1460	CH ₂ doblamiento
1377	CH ₃ doblamiento simétrico (grupos terminales – O-CH ₃)
1260	C-O-C estiramiento (éter/éster)
1164	C-O-C estiramiento (enlace éster)
1100	-C-O-C estiramiento (glucosídico de carbohidratos)
1055	C-O estiramiento (primario)
1040	C-O estiramiento (anillo glucopiranósico)

La muestra L_4 presenta diferencias con las dos antes mencionadas, tiene ausencia de la banda 3,270 cm⁻¹ (menor contenido de grupos hidroxilos), presenta la señal de 1710 cm⁻¹ (C=O de ácidos carboxílicos) y de señales en 1377, 1260, 1160 y 1100 cm⁻¹, asociados a deformaciones CH₃, C-O-C de éster, C-O estiramiento del éster y -C-O-C de los carbohidratos respectivamente.

La aparición de la señal en 1710 cm⁻¹ es característica específicamente de los ácidos grasos libres y su presencia se asocia a la hidrólisis ácida de triglicéridos que ocurre únicamente en esta muestra ya que a pH ácido es fuertemente protonante, lo que activa el carbonilo del triglicérido y facilita que el enlace éster se rompa y se forme un ácido graso libre. Además, el pH ácido desestabiliza los fosfolípidos de membrana, generando mayor coextracción de lípidos polares y compuestos hidrofílicos, lo que se refleja en señales más complejas en la región 1240–1100 cm⁻¹.

En la figura 26 se puede presentar los espectros de FT_IR de las muestra L_10, L_CC y quitosano puro.

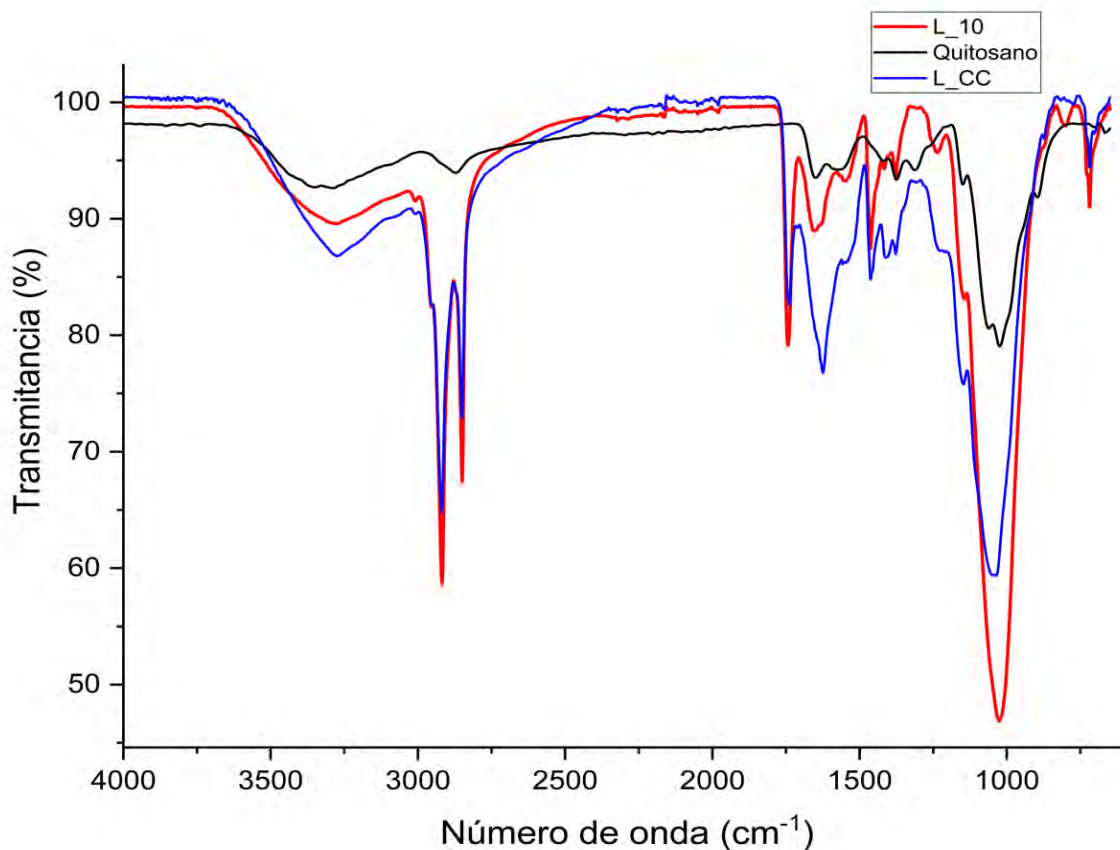


Figura 26. Espectros de FT-IR de lípidos L_10 y quitosano

Los espectros de las muestras de L_10 y quitosano coinciden en las señales 1650 y 1540 cm^{-1} . Estas bandas no son características de lípidos, sino que corresponden a las vibraciones amida I (C=O) y amida II (N-H/C-N) propias del quitosano. González *et al.* (2015) estudia los espectros de FT-IR correspondiente a quitosano e identifican sus bandas características: estiramiento de O-H alrededor de 3450 cm^{-1} , estiramiento de C-H cerca de 2870 cm^{-1} , flexión de CH_2 en 1420 cm^{-1} , estiramientos C-O-C en 1030–1070 cm^{-1} , una banda de amida III, y especialmente las bandas de amida I en 1651 cm^{-1} y amida II en 1540 cm^{-1} (González Carlos *et al.*, 2015).

La presencia de quitosano en los lípidos de la coagulación alcalina se descarta por la comparación con el espectro de L_CC (sin adición de quitosano) donde se observan las mismas señales correspondientes al quitosano. Ambas muestras contienen proteínas residuales y componentes nitrogenados propios de la biomasa microalgal, los cuales también

presentan vibraciones en la región amida I–II. Estas señales probablemente se originan en proteínas, péptidos o restos celulares que no fueron completamente removidos durante la extracción, lo que es consistente con perfiles reportados para lípidos microalgales sometidos a centrifugación o coagulación previa.

4.3.3.1. Análisis termogravimétrico

Por último, en esta etapa se realizó el análisis termogravimétrico de las muestras de lípidos obteniéndose las gráficas mostradas en la figura 27. El análisis de la curva de la tasa de pérdida de peso (DTG) para las muestras demuestra que el proceso de degradación térmica es influenciado mayormente por la composición de la de los lípidos lo cual muestra diferencias significativas con la degradación térmica de materia orgánica donde predomina la celulosa (95%), lignocelulosa y lignina. La degradación es similar al fenómeno observado en la degradación de otros tipos de biomasa de microalgas (Shuping *et al.*, 2010).

Durante la degradación térmica de las muestras de lípidos, se pueden distinguir tres estadios principales durante el proceso de calentamiento:

El primer estadio (I) abarca desde los 35°C hasta aproximadamente los 200 °C. Se observa una ligera pérdida de peso en la curva TGA y un evento leve en la curva DTG, atribuible a la pérdida de humedad y compuestos orgánicos volátiles ligeros (Peng *et al.*, 2001).

El segundo estadio (II) se extiende desde los 200°C hasta 550°C. Este estadio se caracteriza por una pérdida de peso mayor, lo que corresponde al proceso principal de pirolisis de la materia orgánica. En esta etapa, la mayoría de los materiales orgánicos se descomponen, en este caso los lípidos.

En la muestra L_10 se observa un perfil de degradación más concentrado, con un pico de temperatura máximo 408 °C fuerte y singular ubicado entre 260 °C y 440 °C. Esta característica de un solo pico agudo es típica de la degradación de lípidos puros, lo que implica que el proceso de cosecha alcalina fue efectivo en la remoción de contaminantes orgánicos no deseables en esta etapa (Du *et al.*, 2013).

Muestras L_CC (Centrifugación) y L_4 (Coagulación a pH 4): Estas muestras presentan un proceso de descomposición orgánico más amplio y heterogéneo, con su máxima tasa de

pérdida de masa desplazada a temperaturas ligeramente más bajas 375°C a 380°C. Esta cinética es indicativa de la co-degradación simultánea de lípidos, proteínas y carbohidratos (W.-H. Chen *et al.*, 2018) demostrando la presencia de contaminantes no lipídicos.

El tercer estadio (III) se extiende desde 550°C hasta la temperatura final de 800°C. En este estadio, el material carbonoso en los residuos sólidos se descompone continuamente a una tasa muy lenta, lo que se traduce en una ligera pérdida de peso en la curva TGA (Shuping *et al.*, 2010).

El análisis de la curva de la tasa de pérdida de peso (DTG) muestra que, durante el proceso principal de pirolisis, las muestras L_CC y L_4 exhiben dos procesos de descomposición superpuestos correspondientes a la degradación de los lípidos y material no lipídico.

El rasgo más distintivo de las muestras L_CC y L_4 es la presencia de un pico secundario o un hombro entre 450 y 500 °C. Esta señal no corresponde a la descomposición de los lípidos ni a la pirolisis de proteínas (W. H. Chen *et al.*, 2018). Este se puede deber a un residuo sólido y condensado formado por otros contaminantes macromoleculares, como el quitosano residual del proceso de coagulación (Peniche-Covas *et al.*, 1993) o proteínas y polisacáridos estructurales.

El quitosano puede permanecer asociado físicamente a la biomasa durante la extracción, debido a las interacciones electrostáticas y a la estructura del flóculo; sin embargo, su naturaleza altamente hidrofílica y su insolubilidad en solventes orgánicos impiden que migre hacia la fase lipídica. Por lo tanto, el quitosano no contamina los lípidos extraídos.

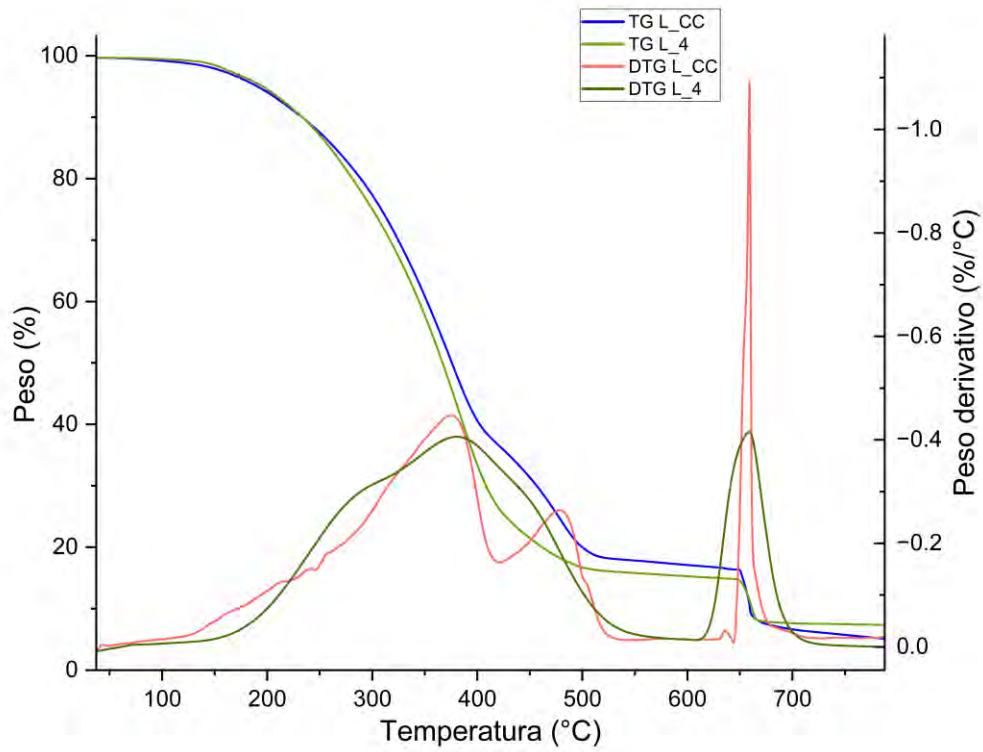


Figura 27. TG´s y DTG´s de las muestras de lípidos.

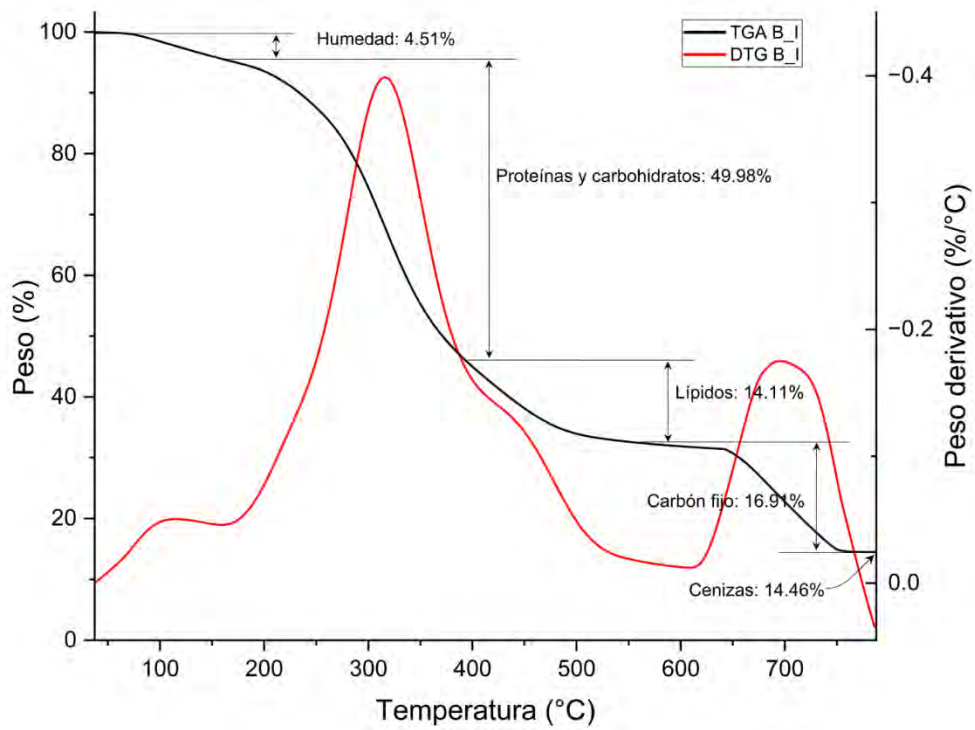


Figura 28. TG y DTG de la biomasa inicial

Tabla 20. Análisis proximal de las muestras de lípidos y biomasa inicial

Muestra	Humedad (%)	Volátiles (%)	Carbón (%)	Cenizas (%)
L_4	5.3170	78.9330	8.2361	7.5139
L_CC	5.9722	76.1872	12.6042	5.2364
B_I	4.5180	64.0995	16.9150	14.4675

En la figura 28 se presenta el termograma y la derivada de este de la muestra de biomasa inicial seca, los picos del DTG son distinto a los obtenidos en los lípidos.

En figura 28 el perfil de degradación de la biomasa es distinto a los presentados en las muestras de lípidos, ya que está compuesto por una mezcla de metabolitos (lípidos, proteínas y carbohidratos) (W. H. Chen *et al.*, 2018) y materia inorgánica. Se distinguen claramente tres etapas.

Etapa I: Pérdida de Humedad y Compuestos Ligeros (35°C a 160 °C)

Se observa una pequeña y gradual pérdida de peso que se atribuye a la evaporación del agua libre y ligada (humedad) y a la volatilización de compuestos orgánicos de muy bajo peso molecular (W. Peng *et al.*, 2001).

Etapa II: Pirolisis Principal de la Materia Orgánica (160°C a 560°C)

Este es la etapa de mayor pérdida de peso y representa la pirolisis de la mayor parte de la materia volátil orgánica de la biomasa.

La curva DTG exhibe un pico principal agudo, centrado aproximadamente en 315 °C. Esta temperatura es significativamente más baja que la temperatura de degradación de los lípidos puros (que típicamente ocurre alrededor de 330 y 550 °C). En biomasa microalgal, la degradación que ocurre en este rango de baja temperatura (160 a 395°C) está dominada por la descomposición de proteínas y carbohidratos no estructurales (W. Peng *et al.*, 2001). Este pico predominante indica que la composición de la biomasa inicial (B_I) está dominada por estos metabolitos. El hombro observado centrado aproximadamente a los 436 °C corresponde a los lípidos, los cuales tienen su descomposición entre los 395 a 560 °C. La forma asimétrica del pico sugiere que la degradación es superpuesta lo que es típico de la biomasa cruda (Peniche-Covas *et al.*, 1993).

Etapa III: Descomposición del Carbón Residual Piro-Resistente y Cenizas (560 a 800 °C)

En este estadio se volatiliza la porción más estable y condensada del material orgánico, que ha formado carbón, dejando el residuo de cenizas final.

La pérdida de peso en este rango de alta temperatura se debe a la combustión lenta del carbón orgánico piro-resistente a los 690 °C.

La formación de carbón es promovida por la reticulación de macromoléculas complejas, como las proteínas y ciertos polisacáridos, durante el calentamiento (Arguelles-Monal *et al.*, 2018). El residuo final de carbón y cenizas a 800 °C se estabiliza en 14.46 %.

La tabla 20 presenta un análisis composicional de la biomasa inicial (B_I) y los lípidos (L_4 y L_CC).

El contenido de cenizas se reduce en las muestras cosechadas (L_4 con 7.51% y L_CC con 5.24%) en comparación con la Biomasa Inicial (B_I con 14.47%).

Esto sugiere que el proceso de cosecha o el acondicionamiento posterior a la cosecha (p. ej., lavado, deshidratación parcial) asociado a las muestras L_4 y L_CC fue altamente efectivo para remover sales y materia inorgánica del medio de cultivo. Una menor concentración de cenizas es altamente deseable en la producción de biocombustibles, ya que reduce la contaminación de los catalizadores y mejora la calidad final del biodiesel.

Las muestras cosechadas (L_4 con 78.93% y L_CC con 76.19%) muestran un contenido de volátiles significativamente mayor que la Biomasa Inicial (B_I con 64.10%).

Dado que los lípidos (triglicéridos) son la fracción más valiosa y volátil de la biomasa orgánica, este aumento en el porcentaje de volátiles, junto con la disminución de cenizas, indica una purificación de la materia orgánica durante el proceso de cosecha. La muestra L_4 (78.93%) representa la materia prima más rica en compuestos orgánicos, potencialmente con la mayor concentración de lípidos recuperables para la transesterificación.

4.3.4. TRANSESTERIFICACIÓN

La figura 29Figura 25 muestra los espectros de infrarrojo procesados de las muestras F_CC, F_4 y F_10, resultado de la reacción de transesterificación de las muestras de lípidos L_CC, L_4 y L_10. Las señales de los grupos funcionales varían entre las tres muestras. Observamos

que la transesterificación de los lípidos produjo cambios espectrales claros y consistentes con la conversión a ésteres metílicos (FAMES). La señal más decisiva es la de la banda 1740 cm^{-1} , que en los FAMES aparece más intensa y estrecha que en los lípidos originales, reflejando la formación de grupos carbonilo de metiléster (RCOO-CH_3). Asimismo, se observaron modificaciones en la región de deformación alifática $1460\text{--}1430\text{ cm}^{-1}$, donde la contribución de CH_3 aumenta debido a la presencia del grupo -O-CH_3 terminal; este fenómeno se hace especialmente evidente en F_10 y F_CC, cuyas bandas son más simétricas y definidas.

No obstante, el comportamiento de F_4 fue notablemente distinto. Esta muestra conserva simultáneamente la banda a 1710 cm^{-1} , indicativa de ácidos grasos libres no convertidos, junto con una banda menos intensa de 1740 cm^{-1} en comparación con F_CC y F_10. Este resultado corrobora que la presencia de FFA derivados de la extracción ácida interfiere en la transesterificación alcalina, promoviendo reacciones de saponificación que consumen parte del catalizador y reducen la eficiencia de conversión. El aumento relativo del hombro 1436 cm^{-1} también sugiere que persisten estructuras parcialmente glicéridos o lípidos polares resistentes a la reacción, lo que coincide con la complejidad observada previamente en L_4. Por el contrario, F_10 exhibe el perfil espectral más limpio: ausencia de FFA (sin banda en 1710 cm^{-1}), marcada intensidad en el estiramiento carbonílico a 1740 cm^{-1} y una reorganización clara de la región $1460\text{--}1430\text{ cm}^{-1}$ hacia modos vibracionales dominados por los grupos metil éster. Estos resultados confirman que la transesterificación fue más eficiente cuando el extracto inicial no contenía subproductos de hidrólisis.

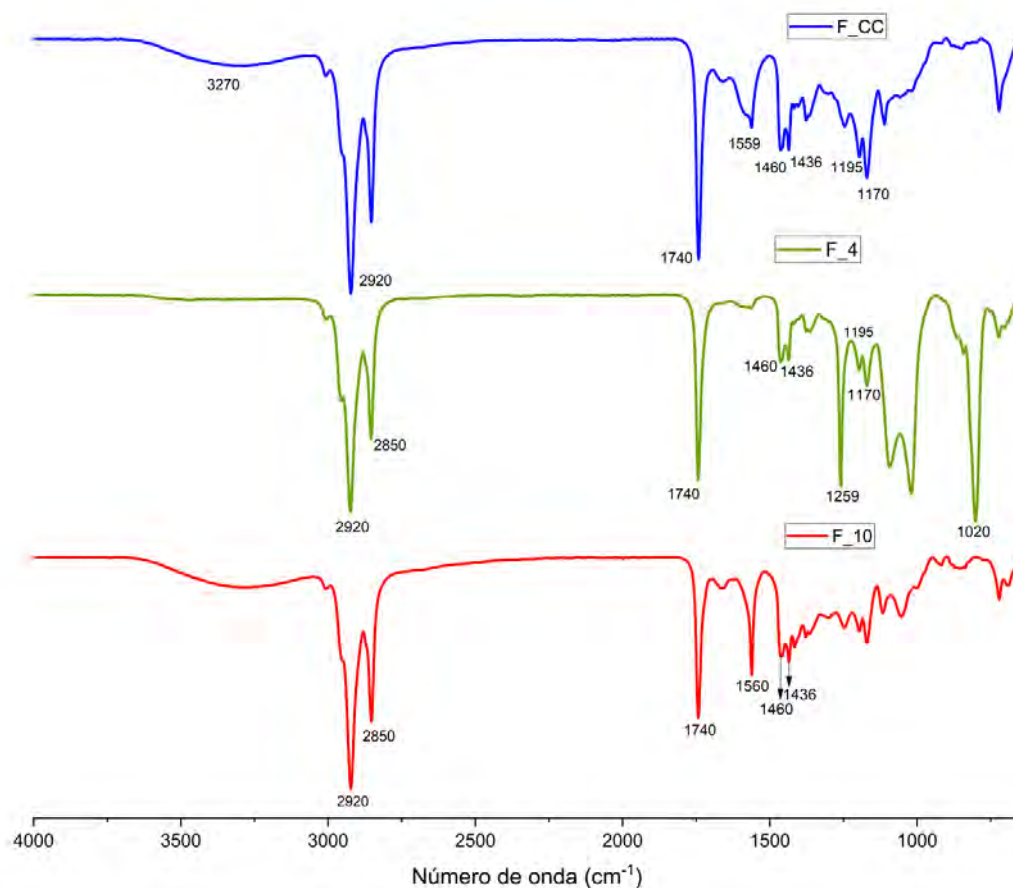


Figura 29. Espectros de Infrarrojo correspondientes a los FAMES

Tabla 21. Identificación de grupos funcionales en lípidos y quitosano.

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
3270	N-H/O-H estiramiento (amidas o hidroxilos)
2920	C-H estiramiento (asimétricos, alifático)
2850	C-H estiramiento (simétrico, alifático)
1740	C=O estiramiento (éster)
1560	COO estiramiento (carboxilato)
1460	CH ₂ doblamiento (metileno)
1436	CH ₃ doblamiento simétrico (metilo)
1377–1375	CH ₃ doblamiento simétrico (grupos terminales –O–CH ₃)
1195	C–O estiramiento (asociado al grupo –O–CH ₃ del metiléster)
1170	C–O–C estiramiento (enlace éster)
1100	C–O estiramiento (estructuras alcoxi del metiléster)
1020	N-H/O-H estiramiento (amidas o hidroxilos)

La región de $1430\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$ resultó fundamental para evaluar la conversión de triglicéridos a FAMEs y para evidenciar los efectos del pH en la integridad del extracto lipídico. En las muestras lipídicas iniciales (L), la banda en 1460 cm^{-1} —asociada al estiramiento asimétrico de --CH_2 y a la vibración de deformación del esqueleto alifático en triglicéridos— aparece intensa y bien definida, lo que indica la presencia de matrices ricas en acilglicéridos. Sin embargo, la muestra extraída en medio ácido (L_4) presenta adicionalmente un hombro en 1436 cm^{-1} , relacionado con vibraciones CH_2 y CH_3 propias de cadenas menos ordenadas o parcialmente hidrolizadas, y que se correlaciona con la banda de 1710 cm^{-1} , evidenciando formación de ácidos grasos libres por hidrólisis ácida.

Los espectros de FT-IR de los FAMEs evidenciaron modificaciones claras asociadas a la conversión a ésteres metílicos. En todas las muestras se observó el fortalecimiento de la banda en 1740 cm^{-1} , junto con la aparición de señales en $1240\text{--}1260$ y 1160 cm^{-1} , correspondientes a estiramientos C--O y C--O--C del enlace éster. Sin embargo, se identificaron diferencias relevantes entre las condiciones evaluadas.

Las muestras F_CC y F_10 presentaron señales adicionales en la región de 1560 cm^{-1} , atribuibles a vibraciones asimétricas de grupos --COO^- (carboxilatos), las cuales han sido asociadas en la literatura a la formación de sales de ácidos grasos y productos de saponificación parcial durante la catálisis básica. La presencia de estas bandas sugiere que, aunque la transesterificación ocurrió, una fracción de los ácidos grasos reaccionó con el catalizador alcalino, reduciendo la conversión a FAMEs.

En contraste, la muestra F_4 mostró una menor contribución relativa de la banda en 1560 cm^{-1} y una señal bien definida en 1740 cm^{-1} , lo que indica que la mayor proporción de los ácidos grasos fue convertida en metil ésteres. Adicionalmente, en la región $1430\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$, F_4 exhibió una reorganización vibracional más marcada y son asociados a grupos CH_3 , atribuibles a la presencia del grupo terminal --O--CH_3 característico de los FAMEs. Este comportamiento confirma un extracto con menos impurezas y con menos costos de inversión para la etapa de purificación final.

En conjunto, el análisis FTIR demuestra que, aunque F_CC y F_10 presentan espectros aparentemente menos simples y menos claros, la presencia de bandas asociadas a carboxilatos evidencia procesos secundarios que limitan la eficiencia de conversión y el arrastre de otros compuestos no deseados. Por el contrario, la muestra F_4 integra una mayor intensidad del estiramiento carbonílico de éster (1740 cm^{-1}), una reorganización clara de la región $1430\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$ y una menor formación de carboxilatos, confirmando que esta es la condición más adecuada para la obtención de un FAME más puro.

4.3.5. CROMATOGRAFÍA DE GASES

En el presente análisis, las muestras F_4 y F_CC mostraron perfiles lipídicos claramente diferenciados (tabla 22). La muestra F_4 se caracterizó por una alta concentración de metil pentadecenoato (C15:1) con un 50.61%, seguido de metil linoleato (30.56%). Esta composición sugiere una mayor proporción de ácidos grasos mono y poliinsaturados de cadena media.

Por otro lado, la muestra F_CC presentó un perfil más diverso y una notable presencia de metil linoleilaidato con un 33.91%. Los ácidos grasos poliinsaturados en microalgas se encuentran naturalmente en configuración *cis*. La presencia de la forma *trans* en F_CC se atribuye a procesos de isomerización química, causados generalmente por factores externos durante el procesamiento o el estado fisiológico de la cepa al momento de la cosecha. Este fenómeno explica por qué el porcentaje total de PUFA en F_CC (58,57 %) es significativamente mayor al de F_4, reflejando una acumulación de estos isómeros de 18 carbonos que difieren de los perfiles optimizados reportados por Lee *et al.* (2025) para sistemas de alta producción lipídica donde identificó que un patrón de alta abundancia de ácidos grasos de cadena media es típico de cianobacterias y algas verdes, en el mismo estudio se mostraron bajos niveles de ácidos poliinsaturados y una preponderancia de saturados y monoinsaturados (Lee et al., 2025).

Tabla 22. Perfil de ácidos grasos de muestras F_4 y F_CC.

		Fórmula molecular	F_4 (%)	F_CC (%)
Metil tridecanoato	C13:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	6.19	4.38
Metil pentadecenoato	C15:1	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	50.61	5.68
Metil palmitoleato	C16:1	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	-	3.93
Metil octadecenoato	C18:1	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	-	19.39
Metil linolelaidato	C18:2 trans	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	3.97	33.91
Metil linoleato	C18:2 cis	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	30.56	22.94
Metil linolenato	C18:3	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	-	1.73
Metil heneicosanoato	C21:0	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	4.36	4.01
Metil behenato	C22:0	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	4.32	4.04

En La tabla 22 se puede observar la diferencia entre las dos muestras, mientras que para F_4 se obtiene 50.61% de C15:1 y la muestra F_4 solo un 5.68%, estos resultados parecen inusuales para perfiles típicos de microalgas, que generalmente sintetizan ácidos grasos de número par de carbonos. Este hallazgo puede atribuirse a una ruta metabólica alternativa de ácidos de cadena impar, la cual suele activarse bajo condiciones de estrés específico.

Por otro lado, para F_4 contiene solo 3.97% de C18:2 trans mientras que F_CC contiene 33.91%, esta diferencia drástica es un indicador crítico de isomerización química. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en las microalgas se encuentran naturalmente en configuración *cis*; sin embargo, factores como la exposición prolongada a altas temperaturas, cambios bruscos de pH o procesos de transesterificación agresivos pueden provocar la reconfiguración de los dobles enlaces hacia la forma *trans*, que es termodinámicamente más estable.

Existen pretratamientos o que favorecen la formación de MUFA (oleico) y PUFA (linoleico) según se preferencia como lo muestra Lee *et al.* (2005) en su estudio indica que el ultrasonido eleva la fracción de oleico de 62 % a 77 % y de linoleico de 51 % a 57 %. En la muestra del usuario, el oleico (representado por metil octadecenoato) está presente solo en F_CC (19.29 %), menor que el incremento inducido por ultrasonido. En general este estudio no dice que los tratamientos de la muestra impactan directamente en los tipos de lípidos que se obtienen (Lee et al., 2025).

Por otro lado, muestras revelaron la presencia de ésteres de cadena larga como el metil heneicosanoato y metil behenato (aprox. 4%). Estos son de cadena más larga (C21:0 y C22:0) están presentes en torno al 4 % en ambas columnas; estos compuestos son menos comunes, pero se reportan ocasionalmente en la base de datos del estudio de Lang et al. (2011).

La determinación de este perfil es esencial, pues las propiedades del biodiésel dependen estrictamente del largo de la cadena carbonada, el grado de insaturación y la configuración geométrica (cis/trans) de los enlaces (Lang et al., 2011).

La muestra F_CC también mostró porcentaje alto de metil linoleato (22.94 %). Así mismo, el metil octadecenoato (derivado del ácido oleico) representó el 19.39% en esta muestra

Al contrastar los resultados obtenidos con el perfil lipídico de *Haematococcus pluvialis* reportado por Sanjurjo *et al.* (2024), se evidencia una divergencia estructural significativa mientras que en el estudio se observa un perfil típico de microalgas verdes dominado por ácidos grasos de cadena larga como el palmítico C16:0 (20.38 %), oleico 18:1 (15 %), linoleico C18:2 (29.92 %) y linolénico C18:3 (15.21 %), las muestras analizadas en este trabajo presentan una anomalía metabólica caracterizada por un 50.61% de metil pentadecenoato (C15:1) y por otro lado coincide con la muestra F_CC en oleico (19.39 %), linoleico (22.94 %) y en F_4 con linoleico (30.56 %) (Sanjurjo et al., 2024).

Esta disparidad sugiere que la cepa o las condiciones de procesamiento empleadas favorecieron la síntesis de cadenas medias e impares (C15) en lugar de las cadenas de 18 carbonos que predominan en la literatura.

CONCLUSIONES

El estudio demostró que la cosecha de la microalga *Haematococcus pluvialis* mediante coagulación-floculación con quitosano es no solo posible, sino altamente eficiente. Se alcanzó una Eficiencia de Recuperación de biomasa (ER) máxima del 95.13% en la prueba de jarras (pH 10, 10 ppm de quitosano y 20rpm), un valor que supera la eficiencia del método por centrifugación (91.85 %).

El modelo estadístico de Superficie de Respuesta confirmó la robustez y la flexibilidad operativa del quitosano, identificando dos mecanismos de floculación igualmente efectivos (neutralización de carga a alta agitación, y puenteo polimérico a baja agitación a pH extremos de 10 y 4). Por lo tanto, la hipótesis se valida al confirmar el éxito de la cosecha con quitosano y demostrar que la condición óptima de floculación mejora la extracción y la transesterificación realizando el tren de tratamiento escalado a pH ácido.

La eficiencia de recuperación de biomasa se incrementó en la etapa de escalamiento, alcanzando el 99.73% a pH 4. La cinética de crecimiento óptima se logró previamente en el *Raceway* (C.8).

Se logró una mayor extracción de lípidos al acoplar la cosecha a condiciones ácidas. La cosecha condujo al mayor rendimiento de extracción lipídica (11.53 %), superando tanto al control por centrifugación como al cultivo cosechado a pH 10. Este resultado confirma que el proceso de cosecha con quitosano aumenta la disponibilidad de lípidos para la extracción posterior. La transesterificación básica induce la formación de carboxilatos no deseados. Estas impurezas darán como resultado baja calidad del biodiésel final.

En síntesis, F_4 mostró un perfil lipídico atípico debido a condiciones experimentales que favorecieron cadenas medias e isómeros trans, alejándose del patrón habitual de ácidos C18 en *H. pluvialis*. En contraste, F_CC presentó un perfil más cercano a lo reportado en la literatura, con niveles de oleico y linoleico dentro de los rangos esperados. Esto confirma que el método de cosecha y el procesamiento influyeron directamente en la composición final de los FAME.

Los resultados de los FAME en F_4 mostraron un perfil lipídico atípico debido a condiciones experimentales que favorecieron cadenas medias e isómeros trans, alejándose del patrón habitual de ácidos C18 en *H. pluvialis*. En contraste, F_CC presentó un perfil más cercano a lo reportado en la literatura, con niveles de oleico (19.39%) y linoleico (22.94%) dentro de los rangos esperados. Esto confirma que el método de cosecha y el procesamiento influyeron directamente en la composición final de los FAME.

Los resultados de la presente tesis demuestran que el uso de la coagulación-floculación con quitosano no solo sustituye de manera eficiente a la centrifugación, sino que, al optimizarse establece un tren que maximiza el rendimiento de extracción de lípidos y la calidad de los FAMEs obtenidos. De esta manera, se incrementa la viabilidad potencial de la producción de biodiésel.

REFERENCIAS

- Ahmad, A. L., Mat Yasin, N. H., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2011a). Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. *Chemical Engineering Journal*, 173(3), 879–882. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.070>
- Ahmad, A. L., Mat Yasin, N. H., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2011b). Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. *Chemical Engineering Journal*, 173(3), 879–882. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.070>
- Ali, S. K., Abdou, M. M., Emara, M. M., Farag, R. S., & Mubarak, M. F. (2025a). Eco-friendly solutions: a comprehensive review of natural coagulants for sustainable water treatment. *Environmental Geochemistry and Health*, 47(12), 535. <https://doi.org/10.1007/s10653-025-02803-3>
- Ali, S. K., Abdou, M. M., Emara, M. M., Farag, R. S., & Mubarak, M. F. (2025b). Eco-friendly solutions: a comprehensive review of natural coagulants for sustainable water treatment. *Environmental Geochemistry and Health*, 47(12), 535. <https://doi.org/10.1007/s10653-025-02803-3>
- Amaro, H. M., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88(10), 3402–3410. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>
- Ammar, S. H., Khadim, H. J., & Mohamed, A. I. (2018). Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental Technology & Innovation*, 10, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.002>
- Banerjee, C., Ghosh, S., Sen, G., Mishra, S., Shukla, P., & Bandopadhyay, R. (2014). Study of algal biomass harvesting through cationic cassia gum, a natural plant based biopolymer. *Bioresource Technology*, 151, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.035>
- Behera, B., & Balasubramanian, P. (2019). Natural plant extracts as an economical and ecofriendly alternative for harvesting microalgae. *Bioresource Technology*, 283, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.070>
- Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). Bold's Basal Medium (BB). In *Phycological studies* (Vol. 44, Issue 1, pp. 1–95).
- Brown, L. M., & Zeiler, K. G. (1993). Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Conversion and Management*, 34(9–11), 1005–1013. [https://doi.org/10.1016/0196-8904\(93\)90048-F](https://doi.org/10.1016/0196-8904(93)90048-F)
- Carbon cloud. (n.d.). *Sulfuric acid (H₂SO₄). E513: Footprint at factory*. Carbon Cloud.
- Chen, H., Zhou, D., Luo, G., Zhang, S., & Chen, J. (2015). Macroalgae for biofuels production: Progress and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.086>
- Chen, L., Wang, C., Wang, W., & Wei, J. (2013). Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. Cultivated in an open-pond system. *Bioresource Technology*, 133, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.071>

- Chen, W. H., Chu, Y. S., Liu, J. L., & Chang, J. S. (2018). Thermal degradation of carbohydrates, proteins and lipids in microalgae analyzed by evolutionary computation. *Energy Conversion and Management*, *160*, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.01.036>
- Chen, W.-H., Chu, Y.-S., Liu, J.-L., & Chang, J.-S. (2018). Thermal degradation of carbohydrates, proteins and lipids in microalgae analyzed by evolutionary computation. *Energy Conversion and Management*, *160*, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.01.036>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. In *Biotechnology Advances* (Vol. 25, Issue 3, pp. 294–306). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chua, E. T., Shekh, A. Y., Eltanahy, E., Thomas-Hall, S. R., & Schenk, P. M. (2020). Effective Harvesting of Nannochloropsis Microalgae Using Mushroom Chitosan: A Pilot-Scale Study. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00771>
- Coleman, C. K., Oza, H. H., Bailey, E. S., & Sobsey, M. D. (2024). A Review of Chitosan as a Coagulant of Health-Related Microorganisms in Water and Wastewater. *Environments*, *11*(10), 211. <https://doi.org/10.3390/environments11100211>
- Damiani, M. C., Popovich, C. A., Constenla, D., & Leonardi, P. I. (2010). Lipid analysis in Haematococcus pluvialis to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, *101*(11), 3801–3807. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.136>
- Demir, I., Besson, A., Guiraud, P., & Formosa-Dague, C. (2020). Towards a better understanding of microalgae natural flocculation mechanisms to enhance flotation harvesting efficiency. *Water Science and Technology*, *82*(6), 1009–1024. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.177>
- Demirbas, A. (2009a). Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Conversion and Management*, *50*(9), 2239–2249. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2009.05.010>
- Demirbas, A. (2009b). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, *50*(1), 14–34. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.09.001>
- Divakaran, R., & Sivasankara Pillai, V. N. (2002). Flocculation of river silt using chitosan. *Water Research*, *36*(9), 2414–2418. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00436-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00436-5)
- Du, Z., Hu, B., Ma, X., Cheng, Y., Liu, Y., Lin, X., Wan, Y., Lei, H., Chen, P., & Ruan, R. (2013). Catalytic pyrolysis of microalgae and their three major components: Carbohydrates, proteins, and lipids. *Bioresource Technology*, *130*, 777–782. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.115>
- Elcik, H., Karadag, D., Kara, A. I., & Cakmakci, M. (2023). Microalgae Biomass Harvesting Using Chitosan Flocculant: Optimization of Operating Parameters by Response Surface Methodology. *Separations*, *10*(9), 507. <https://doi.org/10.3390/separations10090507>
- Ghosh, S., & Das, D. (2015). Improvement of Harvesting Technology for Algal Biomass Production. In *Algal Biorefinery: An Integrated Approach* (pp. 169–193). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6_8

- Goh, B. H. H., Ong, H. C., Cheah, M. Y., Chen, W.-H., Yu, K. L., & Mahlia, T. M. I. (2019). Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *107*, 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.012>
- Goldemberg, J. (2007). Ethanol for a Sustainable Energy Future. *Science*, *315*(5813), 808–810. <https://doi.org/10.1126/science.1137013>
- González Carlos, Valbuena Ana, Celis Beltriz, Perentena Luis, & Colina Marinela. (2015). Degradación oxidativa del quitosano. *Revista Iberoamericana de Polímeros*.
- Grewe, C. B., & Griehl, C. (2012). The carotenoid astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy*, 129–144. <https://doi.org/10.1515/9783110298321.129>
- Grima, E. M., Medina, A. R., Giménez, A. G., Sánchez Pérez, J. A., Camacho, F. G., & García Sánchez, J. L. (1994). Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *71*(9), 955–959. <https://doi.org/10.1007/BF02542261>
- Halim, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. In *Biotechnology Advances* (Vol. 30, Issue 3, pp. 709–732). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.001>
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, *102*(1), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.136>
- Heasman, M., Diemar, J., O'connor, W., Sushames, T., & Foulkes, L. (2000). Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary. *Aquaculture Research*, *31*(8–9), 637–659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00492.x>
- Ho, D. P., Ngo, H. H., & Guo, W. (2014). A mini review on renewable sources for biofuel. In *Bioresource Technology* (Vol. 169, pp. 742–749). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.022>
- International Energy Agency. (2018). World Energy Outlook 2018 Summary. In *IEA Publications, Paris, France*. <https://doi.org/10.1049/ep.1977.0180>
- IPCC. (2022). Global Warming of 1.5°C. In *Global Warming of 1.5°C*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781009157940>
- Iván Muñoz, Cristina Rodríguez, Dominique Gillet, & Bruno M Moerschbacher. (2017, May 31). *Life cycle assessment of chitin and chitosan production*.
- Jung, K. A., Lim, S. R., Kim, Y., & Park, J. M. (2013). Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresource Technology*, *135*, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.025>
- Kang, Z., Kim, B. H., Ramanan, R., Choi, J. E., Yang, J. W., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2015). A cost analysis of microalgal biomass and biodiesel production in open raceways treating municipal wastewater and under optimum light wavelength. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(1), 109–118. <https://doi.org/10.4014/jmb.1409.09019>
- Karpagam, R., Preeti, R., Ashokkumar, B., & Varalakshmi, P. (2015). Enhancement of lipid production and fatty acid profiling in *Chlamydomonas reinhardtii*, CC1010 for biodiesel production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *121*, 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.015>

- Katarzyna, C., & Marquez-Rocha, F.-J. (2004). Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. *Biotechnology(Faisalabad)*, 3(1), 21–34. <https://doi.org/10.3923/biotech.2004.21.34>
- Kim, D.-Y., Lee, K., Lee, J., Lee, Y.-H., Han, J.-I., Park, J.-Y., & Oh, Y.-K. (2017). Acidified-flocculation process for harvesting of microalgae: Coagulant reutilization and metal-free-microalgae recovery. *Bioresource Technology*, 239, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.021>
- Kim, J. H., Affan, Md. A., Jang, J., Kang, M.-H., Ko, A.-R., Jeon, S.-M., Oh, C., Heo, S.-J., Lee, Y.-H., Ju, S.-J., & Kang, D.-H. (2015). Morphological, Molecular, and Biochemical Characterization of Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) Isolated from Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 238–246. <https://doi.org/10.4014/jmb.1410.10032>
- Kim, J. Y., Jung, J. M., Jung, S., Park, Y. K., Tsang, Y. F., Lin, K. Y. A., Choi, Y. E., & Kwon, E. E. (2022). Biodiesel from microalgae: Recent progress and key challenges. In *Progress in Energy and Combustion Science* (Vol. 93). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.peccs.2022.101020>
- Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C. W., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2013). Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 31(6), 862–876. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.006>
- Konucu, M., Tekdal, D., Eker Develi, E., Meers, E., & Fernandes de Souza, M. (2022). *Moringa oleifera* Lam. as a Bioflocculant for Harvesting Microalgae Grown on Agricultural Wastewaters for Feed Production. *Applied Sciences*, 12(24), 12968. <https://doi.org/10.3390/app122412968>
- Lama, S., Muylaert, K., Karki, T. B., Foubert, I., Henderson, R. K., & Vandamme, D. (2016). Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. *Bioresource Technology*, 220, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.080>
- Lang, I., Hodáč, L., Friedl, T., & Feussner, I. (2011). Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: A comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology*, 11, 124. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-124>
- Lee, J. Y., Park, J., Han, S.-I., Jeon, M. S., & Choi, Y.-E. (2025). A comprehensive approach to optimized ultrasound stimulation for enhanced astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis*: The cultivation strategy. *New Biotechnology*, 90, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2025.10.001>
- Leung, D. Y. C., Wu, X., & Leung, M. K. H. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4), 1083–1095. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.10.006>
- Ma, F., & Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production: a review. *Journal Series #12109, Agricultural Research Division, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska–Lincoln*.1. *Bioresource Technology*, 70(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00025-5)

- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, Nidia. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Miao, X., & Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97(6), 841–846. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.008>
- Miranda, R., Latour, I., & Blanco, A. (2020). Understanding the Efficiency of Aluminum Coagulants Used in Dissolved Air Flotation (DAF). *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00027>
- Molina Grima, E., Belarbi, E.-H., Ación Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. (2003). *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)
- Mondal, B., Kapadiya, P., & Jana, A. K. (2023). A zero discharge, carbon-neutral bi-fuel production process for algal biodiesel and renewable hydrogen. *Journal of Cleaner Production*, 425, 138865. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.138865>
- Montingelli, M. E., Tedesco, S., & Olabi, A. G. (2015). Biogas production from algal biomass: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 43, pp. 961–972). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.11.052>
- Moroney, J. V., & Ynalvez, R. A. (2009). Algal Photosynthesis. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000322.pub2>
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 14, Issue 2, pp. 578–597). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. In *Progress in Energy and Combustion Science* (Vol. 37, Issue 1, pp. 52–68). <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- Pandey Ashok, Duu-Jong Lee, Y. C. (2014). *Biofuels From Algae Biofuels From*.
- Pandey, S., Narayanan, I., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., & Vinayagam, R. (2024). Biodiesel production from microalgae: A comprehensive review on influential factors, transesterification processes, and challenges. In *Fuel* (Vol. 367). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.131547>
- Pappa, M., Lama, S., Adriaensens, P., Marchal, W., & Vandamme, D. (2025). Comparative efficiency of bio-coagulants Chitosan and tannin-based coagulant in coagulation-flotation separation of *Chlorella* sp. in saline media. *Bioresource Technology*, 438, 133185. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.133185>
- Patel, M., & Kumar, A. (2016). Production of renewable diesel through the hydroprocessing of lignocellulosic biomass-derived bio-oil: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 58, pp. 1293–1307). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.146>
- Peng, L., Fu, D., Chu, H., Wang, Z., & Qi, H. (2020a). Biofuel production from microalgae: a review. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 18, Issue 2, pp. 285–297). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00939-0>

- Peng, L., Fu, D., Chu, H., Wang, Z., & Qi, H. (2020b). Biofuel production from microalgae: a review. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 18, Issue 2, pp. 285–297). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00939-0>
- Peng, W., Wu, Q., & Tu, P. (2001). Pyrolytic characteristics of heterotrophic *Chlorella protothecoides* for renewable bio-fuel production. *Journal of Applied Phycology*, 13(1), 5–12. <https://doi.org/10.1023/A:1008153831875>
- Peniche-Covas, C., Argüelles-Monal, W., & San Román, J. (1993). A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 39(1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(93\)90120-8](https://doi.org/10.1016/0141-3910(93)90120-8)
- Phycology, A. (2004). Book review Handbook of Microalgal Culture . Biotechnology. *Journal of Applied Phycology*, 159–160. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000044943.45511.5e>
- Ramluckan, K., Moodley, K. G., & Bux, F. (2014). An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel*, 116, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.07.118>
- Raslavičius, L., Keršys, A., Starevičius, M., Sapragonas, J., & Bazaras, Ž. (2014). Biofuels, sustainability and the transport sector in Lithuania. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 32, pp. 328–346). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.019>
- Rasweefali, M. K., Sabu, S., Sreedevi, O. K., Rahman, M. K. R., Shabeeba, T. K., Anoop, K. K., Sasidharan, A., & Sunooj, K. V. (2024a). Influence of chitosan properties and operating parameters on the flocculation efficiency and harvesting of microalgae (*Scenedesmus* sp.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 272, 132894. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132894>
- Rasweefali, M. K., Sabu, S., Sreedevi, O. K., Rahman, M. K. R., Shabeeba, T. K., Anoop, K. K., Sasidharan, A., & Sunooj, K. V. (2024b). Influence of chitosan properties and operating parameters on the flocculation efficiency and harvesting of microalgae (*Scenedesmus* sp.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132894>
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, 103, 444–467. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>
- Renault, F., Sancey, B., Badot, P.-M., & Crini, G. (2009). Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach. *European Polymer Journal*, 45(5), 1337–1348. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.12.027>
- Rodríguez, M. (2002). Emulsification capacity of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 48(3), 271–276. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00258-2)
- Russell, C., Rodriguez, C., & Yaseen, M. (2022). Microalgae for lipid production: Cultivation, extraction & detection. In *Algal Research* (Vol. 66). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102765>

- Saber, M., Nakhshiniev, B., & Yoshikawa, K. (2016). A review of production and upgrading of algal bio-oil. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 58, pp. 918–930). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.342>
- Saliu, F., Magoni, C., Torelli, A., Cozza, R., Lasagni, M., & Labra, M. (2021). Omega-3 rich oils from microalgae: A chitosan mediated in situ transesterification method. *Food Chemistry*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127745>
- Sambusiti, C., Bellucci, M., Zabaniotou, A., Beneduce, L., & Monlau, F. (2015). Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: A comprehensive review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 44, pp. 20–36). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.12.013>
- Sanjurjo, C., Rodríguez, E., Bartolomé, M., González, R., & Hernández Battez, A. E. (2024). Optimizing the conversion of bio-oil from *Haematococcus pluvialis* to fatty acid methyl esters. *Bioenergy Research*, 17(4), 2374–2383. <https://doi.org/10.1007/s12155-024-10794-9>
- Schulz, P. C., Rodríguez, M. S., Del Blanco, L. F., Pistonesi, M., & Agulló, E. (1998). Emulsification properties of chitosan. *Colloid & Polymer Science*, 276(12), 1159–1165. <https://doi.org/10.1007/s003960050359>
- Secretaría de Energía. (2022). *Balance Nacional De Energía*.
- Shelef, G., Sukenik, A., & Green, M. (1984). *Microalgae harvesting and processing: a literature review*. <https://doi.org/10.2172/6204677>
- Show, K.-Y., & Lee, D.-J. (2014). Algal Biomass Harvesting. In *Biofuels from Algae* (pp. 85–110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00005-X>
- Shuping, Z., Yulong, W., Mingde, Y., Chun, L., & Junmao, T. (2010). Pyrolysis characteristics and kinetics of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* using thermogravimetric analyzer. *Bioresource Technology*, 101(1), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.020>
- Sirajunnisa, A. R., & Surendhiran, D. (2016). Algae – A quintessential and positive resource of bioethanol production: A comprehensive review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 66, pp. 248–267). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.024>
- Solana, M., Rizza, C. S., & Bertucco, A. (2014). Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.013>
- Suastes-Rivas, J. K., Romero-Pineda, M. J., Monje-Ramírez, I., Velasquez-Orta, S. B., Velasco, A., & Orta-Ledesma, M. T. (2024). Direct biohydrogen production from chitosan harvested microalgae biomass and an isolated yeast. *Energy Conversion and Management*, 302. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2024.118081>
- The International Energy Agency. (2021). *Net Zero by 2050 A Roadmap for the Global Energy Sector*. www.iea.org/t&c/

- United Nations Conference on Environment & Development. (1992). *Agenda 21*.
<http://www.un.org/esa/sustdev/agenda21.htm>.
- United States Environmental Protection Agency. (2020). *eGRID Summary Tables*.
<https://www.epa.gov/egrid>.
- Vassilev, S. V., & Vassileva, C. G. (2016). Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. In *Fuel* (Vol. 181, pp. 1–33). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.04.106>
- Vyas, A. P., Verma, J. L., & Subrahmanyam, N. (2010). A review on FAME production processes. *Fuel*, 89(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.08.014>
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>
- Wang, Q., Oshita, K., & Takaoka, M. (2021). Flocculation properties of eight microalgae induced by aluminum chloride, chitosan, amphoteric polyacrylamide, and alkaline: Life-cycle assessment for screening species and harvesting methods. *Algal Research*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102226>
- Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., & Chen, Y. (2011). Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*, 102(1), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.017>
- Yin, Z., Zhu, L., Shi, X., Gentili, F. G., & Nugroho, Y. K. (2024). Chitosan- β -cyclodextrin composite flocculants dual-drive for efficient microalgae harvesting: Structural evidences, dehydration process, E-DLVO model behavior and biomass utilization. *Separation and Purification Technology*, 339. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.126498>
- Zhao, Y., Yue, C., Geng, S., Ning, D., Ma, T., & Yu, X. (2019). Role of media composition in biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under two-stage cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(4), 593–602. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-02064-8>
- Zhu, L., Li, Z., & Hiltunen, E. (2018). Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 183. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1183-z>
- Ziolkowska, J. R., & Simon, L. (2014). Recent developments and prospects for algae-based fuels in the US. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 29, pp. 847–853). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.09.021>

ANEXO 1.

Memorias de cálculo para la huella de carbón de la etapa de cosecha comparando los dos procesos usados en la metodología (centrifugación y coagulación con quitosano).

Tabla 23. GWP de insumos y energía

Insumo	GWP	Fuente
Quitosano	6 kgCO ₂ eq kg ⁻¹	.(Iván Muñoz <i>et al.</i> , 2017)
H ₂ SO ₄	0.14 kgCO ₂ eq kg ⁻¹	(Carbon cloud, n.d.)
Mix de energía	0.4322 kg CO ₂ eq kWh ⁻¹	(United States Environmental Protection Agency., 2020)

Tabla 24. Cálculos de los kWh de cada uno de los equipos

Equipo	Potencia (W)	Potencia (kW)	Tiempo (h)	Consumo (kW/h)
Agitador Cole Palmer	12	0.012	0.01666667	0.0002
Centrífuga Solbat C-40	318	0.318	24.99975	7.9499205

Tabla 25. Cálculos para obtener la huella de carbono para el proceso con coagulación con quitosano

Energías	W	kWh	kg CO ₂ eq kWh ⁻¹	kg CO ₂ eq	Biomasa seca (kg)	kg CO ₂ eq kg ⁻¹ biomasa seca
Paletas	12	0.0002	0.4322	0.08644	0.0024596	35.1439

Insumos	mg L ⁻¹	mg	kg	kgCO ₂ eq kg ⁻¹	kgCO ₂ eq		
Quitosano	15	225	0.000225	6	0.00135	0.0024596	0.5488
H ₂ SO ₄	45	675	0.000675	0.14	0.0000945	0.0024596	0.0384
Total							35.7312

Energías	KWh	kg CO ₂ eq kWh ⁻¹	kg CO ₂ eq	Biomasa seca (kg)	kg CO ₂ eq kg ⁻¹ biomasa seca
Centrifuga	7.9499205	0.4322	3.43595564	0.002002	1716.261558
Total					1716.261558