



**EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE *Tetraselmis suecica*:
PROCESO ASISTIDO POR ULTRASONIDO Y SOLVENTES**

***Tetraselmis suecica* LIPID EXTRACTION:
ULTRASONIC AND SOLVENT AIDED PROCESS**

S. Soto-León¹, I. E. Zazueta-Patrón², P. Piña-Valdez², M. Nieves-Soto²,
C. Reyes-Moreno¹ e I. Contreras-Andrade^{1*}

¹Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Blvd. Américas y Josefa Ortiz de Domínguez, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, C.P. 80010.

²Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen s/n, Mazatlán, Sinaloa.

Recibido 23 de Noviembre de 2013; Aceptado 12 de Marzo de 2014

Resumen

Se cultivó *Tetraselmis suecica* para estudiar la cinética de crecimiento en medios limitados por nitrógeno, lo cual permitió establecer los parámetros básicos de cinética microbiológica de los cultivos para la producción lipídica y biomasa residual. En este trabajo se propone una modificación al método tradicional de extracción de aceite por medio del uso de ultrasonido y solventes; este método incluye la metodología de la separación de clorofila de la fase oleosa. Se evaluaron los perfiles de ácidos grasos por medio de cromatografía de gases-masa (MS-CG) a partir del perfil de los metil ésteres de ácidos grasos (FAME) obtenidos por sonotransesterificación, la composición de ácidos grasos observada fue: palmítico, 28.86; esteárico, 28.33; oleico, 16.79; linoleico, 11.71 y linolénico, 14.31%; composición que no se modificó por el efecto del estrés por nitrógeno. Finalmente, se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para encontrar las mejores condiciones del proceso de extracción en función de la cantidad de solvente utilizado (X_1), tiempo de sonicación (X_2) y potencia acústica (X_3), utilizando sonicación con pulsos y sin pulsos. Las mejores condiciones para el proceso fueron: $X_1 = 5 \text{ mL g}^{-1}$, $X_2 = 6 \text{ h}$ y $X_3 = 160 \text{ W}$, y un proceso sin pulsos; dichas condiciones aseguran una eficiencia de extracción de 94.98%.

Palabras clave: microalgas, biodiesel, ultrasonido, *Tetraselmis suecica*, perfil lipídico.

Abstract

The growth kinetics of *Tetraselmis suecica* cultured in nitrogen-limited media was evaluated; this allowed establishing the microbiological basic kinetic parameters of cultures to lipid and residual biomass production. This paper proposes a methodology to modify the traditional oil solvent-extraction by using high efficient ultrasound; this method includes separation process of chlorophyll from oil phase. Mass spectroscopy coupled to gas chromatography (MS-GC) was used to determine the fatty acid profile (FAP) from the final composition of the fatty acid methyl esters (FAME) obtained from oil sonotransesterification. FAP was not altered by the effect of nitrogen stress, and it was observed that oil composition of *Tetraselmis suecica* was: palmitic acid, 28.86; stearic acid, 28.33; oleic acid, 16.79; linoleic acid, 11.71, and linolenic acid, 14.31 wt.%. Finally, the response surface methodology (RSM) was used to find the best operational conditions of the extraction process in terms of the quantity of solvent used (X_1), sonication time (X_2) and ultrasonic power (X_3), with pulses and without pulses of sonication. The best extraction process conditions with continuous sonication occurred at $X_1 = 5 \text{ mL g}^{-1}$, $X_2 = 6 \text{ h}$ and $X_3 = 160 \text{ W}$, ensuring an extraction efficiency of 94.98%.

Keywords: microalgae, biodiesel, ultrasonic, *Tetraselmis suecica*.

*Autor para la correspondencia. E-mail: ica@uas.edu.mx

1 Introducción

La producción de biocombustibles de tercera generación provenientes, principalmente de cultivos intensivos de microalgas marinas (MIM), es uno de los principales retos que recientemente ha impulsado la eminente crisis global de energéticos. El uso de MIM tiene diversas ventajas: debido a su alta eficiencia fotosintética y tasas de producción de biomasa hace que no se requieran grandes extensiones de tierra usada para la agricultura, comparados con otros cultivos como *Jatropha curcas*, Palma africana, etc.; y por consecuencia no compiten con la producción de alimentos. Las microalgas han colonizado una gran variedad de ambientes, que van desde los climas con aguas calientes, hasta las aguas frías; algunas muestran resistencia a condiciones de desecación, alta salinidad y baja intensidad luminosa. Su metabolismo tan versátil les permite adaptarse a estos ambientes tan hostiles, por ejemplo, ante una situación de baja disponibilidad de nitrógeno, necesario para la síntesis de proteínas para el crecimiento y la división celular, el metabolismo de las microalgas se dirige a la síntesis de carbohidratos o de lípidos (Anzueto, 2008). En general, el crecimiento de las microalgas requiere de un suministro suficiente de fuente de carbono y radiación solar o lumínica (Yoo y col., 2010). Por eso, es de fundamental importancia establecer las condiciones fisicoquímicas óptimas para el cultivo de las microalgas con el propósito de maximizar la producción de biomasa. En este sentido, la temperatura y composición del medio de cultivo tienen un impacto significativo en la tasa de crecimiento (Montagnes y col., 2003), tamaño de la célula (Atkinson y col., 2003), y su composición bioquímica (Thompson y col., 1992). Es importante resaltar que el contenido lipídico de las microalgas puede variar en un amplio rango dependiendo de la especie. La composición química del aceite depende entre otros factores del tipo de microalga utilizada, composición del sustrato y condiciones ambientales del cultivo (Gong y Jiang, 2011), es bien sabido que el perfil lipídico de muchas MIM constituyen una fuente alterna de lípidos para la producción de biodiesel (Minowa y col., 1995).

Por otro lado, el proceso general para la obtención de aceite de las microalgas consiste, básicamente en tres etapas: cultivo, cosecha y extracción de aceite; cuando la cantidad de biomasa alcanza el valor máximo posible en el fotobioreactor, se lleva a cabo su separación y/o concentración a través de algún método o combinación de métodos que incluyen de

manera convencional la sedimentación, floculación, centrifugación y/o filtración, y finalmente se lleva a cabo la lisis celular y la extracción de aceite. El proceso de extracción de aceite de la biomasa de microalgas, ya sea seca o húmeda, y su eficiencia, representa un paso clave muy importante en el proceso de la producción de biodiesel. Por lo tanto, es esencial encontrar una metodología de extracción eficaz para aumentar el rendimiento de extracción de lípidos (Lee y col., 2010; De la Guardia y Armenta, 2011). En la literatura existen varios métodos químicos reportados para este propósito (Ranjan y col., 2010), asistidos la mayoría de ellos con solvente, tales como extracción Soxhlet con n-hexano (Halim y col., 2011), extracción con fluido supercrítico con CO₂ (Andrich y col., 2005) o metanol (Patil y col., 2011) y el método de Bligh y Dyer con una mezcla solvente de cloroformo/metanol (Bligh y Dyer, 1959). También se tienen metodologías libres de solventes que utilizan molinos bola y prensado expeler (Richmond, 2004), enzimas (Sander y Murthy, 2009), extracción por pirólisis asistida por microondas (Du y col., 2011), extracción asistida por ultrasonido y microondas, campo eléctrico pulsante y licuefacción hidrotérmica (Brown y col., 2010). En la mayoría de los casos, la extracción se realiza a escala de laboratorio, y por lo tanto el desafío es escalar el proceso sin perder rendimiento, calidad en la recuperación del aceite y la rentabilidad. Por ello, el objetivo de este estudio fue encontrar las mejores condiciones para la extracción de aceite de *Tetraselmis suecica* usando el método de Bligh y Dyer (1959) modificado con irradiación ultrasónica, utilizando microalgas frescas.

2 Materiales y métodos

2.1 Microorganismos

La cepa de la microalga a evaluar *Tetraselmis suecica* se obtuvo de la colección de microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), la cual se seleccionó de acuerdo a su alto contenido de ácidos grasos reportado en la literatura (Chisti, 2007).

2.2 Cultivo

2.2.1 Cinética de crecimiento y análisis proximal

Se utilizó agua de mar de la bahía de Mazatlán la cual fue pasada a través de tres filtros de cartucho

colocados de manera sucesiva con capacidad de retención de 10, 5 y 1 μm , y a través de un filtro de cartucho de carbón activado. Después de la filtración el agua fue desinfectada con hipoclorito de sodio comercial al 5% a razón de 1 mL L^{-1} . Previa a la utilización del agua se eliminó el contenido de cloro residual adicionando 56 mg de tiosulfato de sodio por cada mL de hipoclorito de sodio agregado (Hemerick, 1973); para la aceleración del proceso se proporcionó abundante aireación durante 20 minutos; posteriormente, la ausencia de cloro residual se determinó mediante el método colorimétrico basado en el indicador ortotoluidina. Durante todo el proceso experimental la concentración de sal del agua de mar fue manejada a condiciones naturales de la bahía de Mazatlán que se encuentra a una concentración aproximada de 35%. Como fuente de nutrientes se utilizó el medio F reportado por Guillard y Ryther (Guillard y Ryther, 1962) con la metodología propuesta por Voltolina y col. (1989), quienes sugieren un contenido de 150 g L^{-1} de NaNO_3 . La concentración original de NaNO_3 del medio F (150 g L^{-1}) se manejó como control. Se evaluó el efecto de la deficiencia de nitrógeno estudiando cinco niveles de concentración de NaNO_3 disminuyendo el medio F en un factor de dos, es decir, F/2, F/4 y F/8, conteniendo un 50, 25 y 12.5% de NaNO_3 respectivamente, y un tratamiento en ausencia de este compuesto. En consecuencia, las cantidades de NaNO_3 fueron de 0, 18.5, 37.5, 75 y 150 g L^{-1} para los medios sin nitrógeno, F/8, F/4, F/2 y F, respectivamente. Se agregaron los nutrientes a una tasa volumétrica de 1 mL L^{-1} de agua de mar para cada tratamiento. Los inóculos de los cultivos de microalgas se efectuaron con la técnica de transferencias sucesivas, se desarrollaron cuatro réplicas de cada tratamiento, los cuales se cultivaron en fotobioreactores de 3 L. El aire se suministró al cultivo de forma continua con un soplador de 2.5 hp de potencia, previamente filtrado con un cartucho de 1 μm , la intensidad de luz fue de 6000-6500 luxes (120-130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). La temperatura del bioreactor se mantuvo constante a $25^\circ\text{C} \pm 1$. La concentración celular se determinó mediante conteo, empleando un microscopio compuesto equipado con hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y cámara de Neubauer. La composición proximal de las microalgas fue estimada con las técnicas analíticas convencionales, usando muestras filtradas en filtros Whatman GF/C de 25mm. La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry y col. (Lowry y col., 1951), previa extracción en calor

durante 15 minutos con hidróxido de sodio 0.1N. La extracción y determinación de los carbohidratos se realizó con ácido sulfúrico de acuerdo a Dubois y col. (1956). Y finalmente, la extracción de los lípidos totales se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Bligh y Dyer (1959) y cuantificación con el método de Pande y col. (1963).

2.2.2. Producción de biomasa para extracción de aceite

Se utilizó el mejor tratamiento en términos de la mínima concentración de nitrógeno necesaria para mantener la mayor producción de biomasa y aceite. El cultivo se desarrolló en 17 foto-bioreactores de 19 L cada uno. Para cosechar la microalga se realizó un proceso de floculación-sedimentación utilizando una solución de $\text{Cl}_2(\text{OH})\text{Al}$ (1 mL L^{-1}) seguida de centrifugación, para obtener una pasta concentrada de MIM.

2.3 Proceso de extracción y purificación de aceite

2.3.1 Extracción

Se realizaron modificaciones al proceso convencional propuesto por Bligh y Dyer (1959). Para ello, se utilizó una mezcla de cloroformo/metanol (2:1) para suspender 10 gramos de microalga húmeda. La suspensión fue sometida a irradiación ultrasónica por medio de un procesador ultrasónico de alta eficiencia modelo UP200S, Hielscher Ultrasonics, con potencia de salida nominal de 200 W y cuyas vibraciones mecánicas se generan por medio de excitación electrónica a una frecuencia de 24 kHz. Para transmitir la potencia acústica al medio se utilizó un sonotrodo modelo S14, variándose la amplitud (relacionada directamente con la densidad y potencia acústica). Posteriormente, previo a separación de biomasa y fase líquida por centrifugación, se ajustó la proporción cloroformo/metanol/agua (2:1:0.8). Así, la fase líquida obtenida fue sometida a un ajuste final en la proporción cloroformo/metanol/agua (2:2:1.8) y transferida a un embudo de separación para recuperar la fase no acuosa después de 12 horas. A la fase sólida obtenida (pasta residual) se le determinó el contenido de lípidos utilizando un sistema de extracción Soxhlet empleando hexano como disolvente (AOAC, 1990).

2.3.2. Purificación y concentración de aceite

La fase no acuosa fue transferida a una columna de carbón activado, se eluyó con cloroformo para separar la clorofila. El exceso de solvente se removió en un evaporador rotatorio al vacío, Yamato, modelo RE300, a una temperatura de 40°C.

2.4 Perfil de ácidos grasos

Para la caracterización del perfil lipídico se llevó a cabo la sonotransesterificación del aceite extraído para cada tratamiento. Esta reacción se desarrolló utilizando una relación molar metanol/aceite (60:1) y 0.85% en peso de KOH como catalizador, en un procesador ultrasónico modelo UP200S Hielscher Ultrasonics por un tiempo de 60 segundos, de acuerdo a la metodología propuesta por Soto-León y col. (2013). El glicerol se separó por evaporación rotatoria al vacío y finalmente, la fase oleosa se filtró usando filtros Whatman de 0.22 μm . El análisis cualitativo de la composición de los FAME (se utilizó un estándar de referencia de 37 componentes marca Supelco) se realizó en un equipo de cromatografía de gases Agilent 6890N con espectrómetro de masas Agilent 5973, columna Omega Wax 250, Helio como gas acarreador e inyector automático serie 7683. Las condiciones de operación fueron: volumen de inyección, 1 μL ; flujo, 1 mL min^{-1} ; temperatura de columna, 50°C a 270°C (10 min) con una tasa de calentamiento de 5°C min^{-1} .

2.5 Diseño experimental y análisis estadístico

Para encontrar las mejores condiciones de extracción de aceite, se utilizó la metodología de superficie respuesta, donde las variables de entrada fueron la cantidad de solvente (cloroformo-metanol 2:1) utilizado por unidad de masa de microalga (X_1), estudiada de 1- 5 mL g^{-1} ; tiempo de sonicación (X_2), en intervalos de 1- 6 h; y potencia acústica (con pulsos y sin pulsos) (X_3), en el rango de 80 a 160

W; la Tabla 1 muestra los niveles correspondientes de estos factores y tratamientos experimentales. La variable de respuesta fue el rendimiento de aceite extraído, utilizando por un lado pulsos ultrasónicos (Y_{CP}), y por otro, suministrando potencia continua (sin pulsos) (Y_{SP}). Se utilizó el software Design-Expert 9.0.1 con un diseño central de 3 factores y 5 niveles, resultando así un total de 20 tratamientos diferentes para cada condición de suministro de potencia ultrasónica (Montgomery, 1991; Gutiérrez-Pulido y Vara-Salazar, 2005). Para encontrar la relación entre las variables de proceso y de respuesta se utilizó un modelo polinomial (de tercer orden reducido para la sonicación con pulsos y de segundo orden para la sonicación sin pulsos) descrito por la siguiente ecuación:

$$Y_k = \beta_{ko} + \sum \beta_{ki} X_i + \sum \beta_{kii} X_{2i} + \sum \sum \beta_{kij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

En donde X_1 , X_2 , X_3 son las variables de proceso o entrada; Y_1 , Y_2 las variables de respuesta o salida, y, β_{ko} , β_{ki} , β_{kii} , β_{kij} los parámetros estimados correspondientes a los términos independiente, lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente, generados por regresión lineal. Se realizó análisis de modelo y coeficientes de correlación para medir la adecuación del modelo. Los términos que resultaron no significativos ($p > 0.05$) fueron excluidos del modelo inicial y los datos experimentales fueron nuevamente introducidos solamente al nivel de parámetros significativos ($p < 0.5$) para obtener el modelo final reducido. Algunas variables fueron incluidas en el modelo final aun cuando presentaron un nivel de significancia de $p > 0.5$ debido a que los términos cuadráticos o de interacción que contenían a esta variable fueron significativos ($p < 0.5$). Finalmente, se detectaron las mejores condiciones de extracción de aceite y mediante la utilización del mejor modelo de predicción, se procedió a establecer la eficiencia máxima de extracción.

Tabla 1. Factores y niveles en el diseño experimental

Niveles	X_1 , Cantidad de solvente (mL/g)	X_2 , Tiempo de sonicación (h)	X_3 , Potencia acústica (W)
$-\alpha$	1.00	1.00	80.00
-1	1.81	2.01	96.21
0	3.00	3.50	120.00
+1	4.19	4.99	143.79
$+\alpha$	5.00	6.00	160.00

Particularmente para este trabajo se consideró X_1 = cantidad de solvente (cloroformo-metanol 2:1) utilizado por unidad de masa de microalga, X_2 = tiempo de sonicación, X_3 = potencia acústica (con pulsos y sin pulsos), y Y = rendimiento de aceite extraído (Y_{CP} , Y_{SP}).

3 Resultados y discusión

3.1 Cinética de crecimiento en función del medio limitante de nitrógeno

La Fig. 1 muestra el comportamiento cinético de *Tetraselmis suecica* bajo las distintas condiciones del medio de cultivo. Todos los medios nutritivos se inocularon inicialmente con una concentración celular de $50,000 \text{ cel mL}^{-1}$ y se asumió que la fase de latencia (adaptación del microorganismo al medio) duró un día; en consecuencia, a partir de este tiempo inicia la fase de crecimiento exponencial terminando en el tercer día, en donde a su vez inicia la fase estacionaria que se caracteriza por la disminución del crecimiento celular debido a que decae la concentración de nutrientes; finalmente, cuando los nutrientes son muy escasos, se presenta la fase de muerte microbiológica. En esta figura se incluye la fase de crecimiento (en forma linealizada) para los cuatro medios nutritivos; para esto, las gráficas logarítmicas inician en tiempo cero al término de la fase de latencia. El medio F/2 mostró la constante específica de crecimiento más alta, de tal forma que en estas condiciones el tiempo de duplicación de la concentración de microorganismos es de 0.7351 días (Tabla 2); asumiendo el modelo cinético para este medio presentado en la Tabla 3, es posible deducir que para F/2, aun cuando tiene un valor de intercepto en la ordenada menor que los otros medios nutritivos, el cultivo requeriría de sólo 2.31 días para que la concentración celular se iguale a la del medio control F, 1.47 días al del medio F/4 y solamente 0.77 días respecto al medio F/8. Asimismo, aun cuando la densidad celular del medio F/2 fue elevada, esta se mantuvo ligeramente por debajo de la correspondiente al medio F; aunque la biomasa base seca resultó notablemente mayor para F/2, en comparación con los medios restantes, esto debido a un mayor contenido de biomasa orgánica. El medio F resultó con un mayor contenido de lípidos seguido por el medio F/2 con un valor de 18.52% base seca; estos resultados se encuentran dentro del rango reportado (15 a 23%) en la bibliografía para esta especie (Chisti, 2007). La productividad lipídica

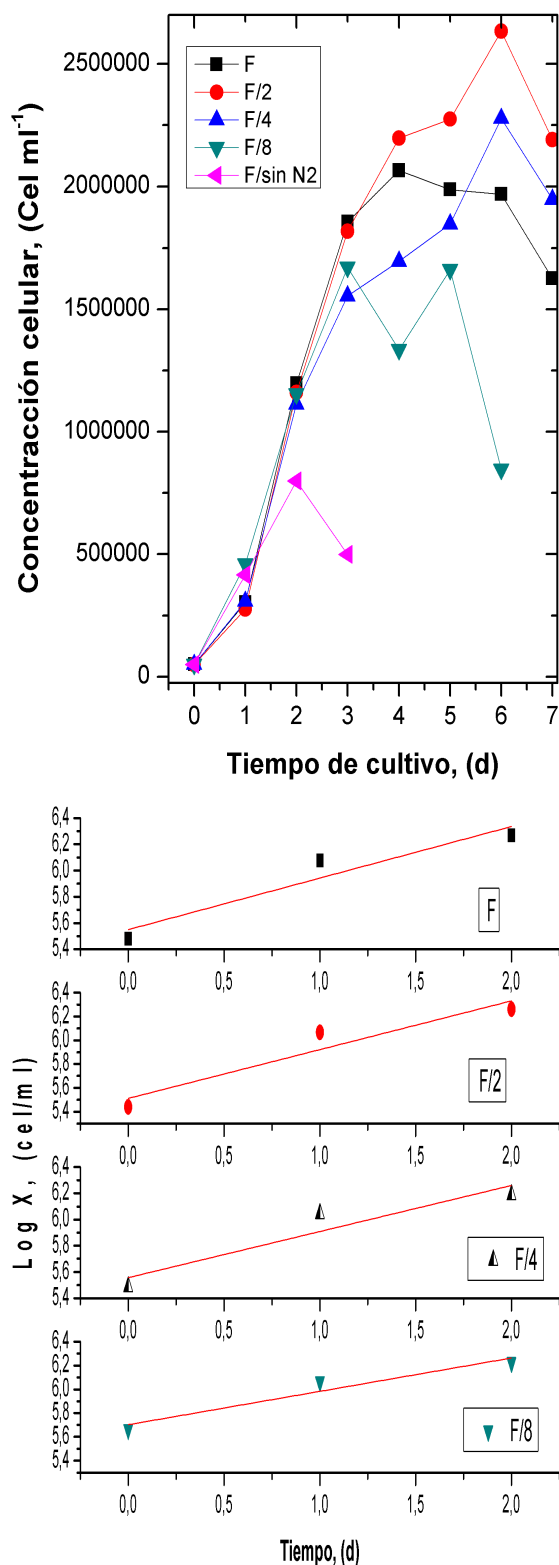


Fig. 1. Cinética de crecimiento microbiológico de *Tetraselmis Suecica*.

Tabla 2. Parámetros cinéticos y composición bioquímica en función del medio de cultivo

Medio de cultivo	F	F/2	F/4	F/8
Constante específica de crecimiento, μ (d^{-1})	0.9067	0.9431	0.8099	0.6451
Tiempo de duplicación, td (d)	0.7646	0.7351	0.8559	1.0747
Densidad celular ¹ ($\times 10^6$ cel/mL)	2.850	2.558	2.031	1.218
Biomasa seca ¹ ($\mu g/mL$)	246.51	298.55	263.54	207.06
Biomasa orgánica ¹ ($\mu g/mL$)	187.57	230.85	219.30	149.55
Lípidos totales ¹ ($\mu g/mL$)	62.77	55.30	42.98	19.02
Lípidos totales ² (%)	-	0.93	-	-
Proteínas ¹ ($\mu g/mL$)	166.15	108.86	61.91	50.72
Carbohidratos ¹ ($\mu g/mL$)	59.42	145.29	166.60	113.13

¹Datos obtenidos de biomasa cosechada en la etapa estacionaria a 4 días del tiempo de cultivo

²Datos obtenidos de la pasta residual después de extraerle el aceite en base a la metodología descrita

Tabla 3. Productividad de lípidos para los distintos medios de cultivo

	F	F/2	F/4	F/8
Modelo	$\ln X = 12.7791 + 0.9067t$	$\ln X = 12.6948 + 0.9431t$	$\ln X = 12.7975 + 0.8099t$	$\ln X = 13.1331 + 0.6451t$
Lípidos (% base seca)	25.46	18.52	16.31	9.19
Productividad promedio de lípidos ($\mu g/mL/d$)	15.69	13.82	10.75	4.76

mantuvo este mismo comportamiento observándose que el medio F/2 resultó con un valor relativamente similar al obtenido con el medio F (Tabla 3), lo cual presenta grandes ventajas desde el punto de vista de su escalamiento, pues se pudiera ahorrar la mitad de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo; los resultados observados son comparables con los datos reportados por Mata y col., (2010) para un grupo de 14 especies de microalgas marinas y por Sánchez-García y col., (2013) para *Tetraselmis suecica*.

Al tiempo de muestreo (4 días) el medio F mantuvo el valor más elevado de densidad celular (hay que observar que a este tiempo todos los medios se encontraban ingresando a la fase estacionaria, es decir, que la concentración de los nutrientes habría decaído más allá de cierto valor de tal forma que el modelo cinético deja de ser válido debido a que se encuentra fuera de la fase exponencial de crecimiento). Si en el medio F/2 se mantuviera la concentración de nutrientes en un rango tal que el cultivo se pudiera

mantener en la fase exponencial -muy próxima a la fase estacionaria- podríamos prever que a un tiempo equivalente de muestreo, la densidad celular alcanzaría un valor de 5.5×10^6 cel mL^{-1} lo que equivaldría a una productividad lipídica de alrededor de $29.75 \mu g mL^{-1} d^{-1}$, lo cual está en concordancia con resultados obtenidos con otras especies de microalgas (De la Hoz y col., 2012).

Un resultado importante es que el contenido total de lípidos disminuyó en la medida en que los distintos medios de cultivo contenían menos nitrógeno, aunque es evidente que este comportamiento no es directamente proporcional; por ejemplo, del medio F al F/2 se disminuyó a la mitad el contenido de nitrógeno pero el contenido de lípidos no se redujo a la mitad (la reducción fue de alrededor de una quinta parte). Algo similar se observó en los subsecuentes tratamientos; en contraste, se observó un incremento en la concentración de carbohidratos y una disminución en la contenido

de proteínas (Tabla 2), de hecho, esta es la razón principal del por qué se eligió esta especie ya que tiene una producción importante de lípidos y un alta producción de carbohidratos susceptibles para la producción de bioetanol. Estos resultados son consistentes con los reportes de Bondioli y col. (2012) quienes trabajaron con *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis sp.* Otros autores coinciden en que una condición de estrés por limitación de nitrógeno provoca una respuesta de adaptación metabólica por parte del microorganismo (Alonso y col., 2012), dirigiéndose hacia la producción de mayores reservas energéticas (Azma y col., 2011; Converti y col., 2009; Wong y Franz, 2013). El decremento en el contenido proteínico es consecuencia de la respuesta fisiológica del microorganismo al nutriente limitante (N); la insuficiencia de nitrógeno bajo la condición de suministro constante de energía luminosa conduce a la microalga a inhibir el anabolismo, redirigiendo, en consecuencia, el exceso energético hacia la síntesis de compuestos carentes del nutriente

limitante (triacilglicéridos, o en su defecto, hacia carbohidratos); es decir, que la proporción de lípidos no polares se incrementa cuanto mayor es la limitación de nitrógeno. El resto de energía incidente es disipada por el microorganismo (Klok y col., 2013).

3.2 Efecto de la cantidad de solvente, tiempo de sonicación y potencia de acústica sobre el nivel de extracción de aceite

La Tabla 4 muestra el total de combinaciones entre cantidad de solvente (cloroformo-metanol 2:1) utilizado por unidad de masa de microalga, tiempo de sonicación y potencia acústica (con pulsos y sin pulsos) correspondientes al modelo experimental de extracción de aceite de *Tetraselmis suecica*. Asimismo, también se muestran los resultados obtenidos en rendimiento de aceite extraído para cada tratamiento.

Tabla 4. Diseño experimental^a para la extracción de aceite en *Tetraselmis suecica* que incluye los valores de las variables^b de entrada y de salida

Tratamiento	Variables de entrada			Aceite extraído, (base seca)	
	X_1 (mLg ⁻¹)	X_2 (h)	X_3 (W)	Y_{CP} (%)	Y_{SP} (%)
1	3.00	3.50	120.00	4.43	6.13
2	4.19	4.99	143.79	7.55	11.16
3	1.00	3.50	120.00	2.97	5.09
4	5.00	3.50	120.00	6.38	10.09
5	3.00	6.00	120.00	5.66	8.73
6	3.00	3.50	120.00	5.35	8.59
7	3.00	3.50	120.00	5.20	8.71
8	4.19	4.99	96.21	6.15	10.01
9	3.00	3.50	120.00	4.89	6.05
10	3.00	3.50	120.00	5.05	6.36
11	3.00	3.50	80.00	4.86	5.53
12	1.81	2.01	143.79	3.73	3.91
13	4.19	2.01	143.79	6.18	8.33
14	4.19	2.01	96.21	4.83	9.17
15	3.00	3.50	120.00	5.50	8.10
16	1.81	4.99	143.79	3.62	6.82
17	1.81	4.99	96.21	4.37	7.17
18	3.00	1.00	120.00	3.29	4.48
19	1.81	2.01	96.21	2.26	3.67
20	3.00	3.50	160.00	4.39	7.93

^a Central con tres factores, cinco niveles. ^b X_1 = cantidad de solvente, X_2 = tiempo de sonicación, X_3 = potencia acústica, Y_{CP} = aceite extraído utilizando sonicación con pulsos, Y_{SP} = aceite extraído utilizando sonicación sin pulsos

Tabla 5. Análisis de varianza de los datos experimentales obtenidos con sonicación con pulsos (modelo cúbico reducido)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Fv	p-value
X_1	19.82	1	19.82	88.61	0.0001
X_2	5.52	1	5.52	24.66	0.0008
X_3	0.11	1	0.11	0.50	0.4965
X_1^2	0.099	1	0.099	0.44	0.5220
X_2^2	0.34	1	0.34	1.51	0.2498
X_3^2	0.14	1	0.14	0.63	0.4463
X_1X_2	0.059	1	0.059	0.26	0.6194
X_1X_3	0.52	1	0.52	2.31	0.1628
X_2X_3	0.58	1	0.58	2.60	0.1415
$X_1^2X_3$	1.09	1	1.09	4.89	0.0542
Error total	0.72	5	0.14		
Error corr.	30.61	19			

3.2.1. Modelos de predicción

Para obtener los modelos predictivos, se estudió estadísticamente el efecto de las variables de entrada sobre el nivel de aceite extraído.

3.2.1.1. Extracción de aceite utilizando sonicación con pulsos (Y_{CP})

Los valores experimentales de Y_{CP} variaron de 2.26 a 7.55 obteniéndose un modelo de regresión para la extracción de aceite (Ec. 2). La Tabla 5 muestra el análisis de varianza correspondiente al tratamiento de los datos, aplicando un modelo polinomial de tercer orden reducido. Se observa que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en dos términos lineales (X_1 , X_2) y en uno de interacción ($X_1^2X_3$); los términos restantes fueron no significativos ($p > 0.05$).

$$Y_{CP} = -20.567 + 12.415X_1 + 1.681X_2 + 0.190X_3 + 0.049X_1X_2 - 0.094X_1X_3 - 0.008X_2X_3 - 2.108X_1^2 - 0.069X_2^2 - 0.0002X_3^2 + 0.017X_1^2X_3 \quad (2)$$

Al excluir los términos no significativos y procediendo nuevamente con la estimación del modelo, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y_{CP} = -17.747 + 12.489X_1 + 1.342X_2 + 0.148X_3 - 0.094X_1X_3 - 0.008X_2X_3 - 2.092X_1^2 + 0.017X_1^2X_3 \quad (3)$$

Con un valor $R^2 = 0.9179$ y donde X_1 , X_2 , $X_1^2X_3$ son términos significativos. Los términos restantes a pesar de ser no significativos, fueron incluidos en el modelo final debido a que se manifiestan como factores en una interacción que sí es significativa ($X_1^2X_3$). Es importante notar que la potencia acústica (X_3) no tiene por sí misma un efecto significativo en la extracción de aceite. Sin embargo, se observa que la cantidad de solvente (cloroformo-metanol 2:1) utilizada por unidad de masa de microalga (X_1) tiene una gran influencia en el nivel de extracción; la interacción cuadrática-lineal entre X_1 y X_3 hace que el nivel de extracción sea más elevado cuanto mayor sea la cantidad de solvente y la potencia acústica; mientras que la extracción pierde fuerza a valores bajos de potencia aunque la cantidad de solvente se mantenga relativamente elevada; es decir, la potencia de las ondas acústicas vibratorias influyen en mayor medida cuanto mayor es la cantidad de solvente utilizado (Fig. 2). Por otra parte, aun cuando la interacción X_2X_3 resultó ser no significativa, es posible apreciar que la máxima interacción (negativa) se presenta a tiempo elevado y potencia acústica de baja intensidad (Fig. 3). En conclusión, cuando el proceso de extracción asistido por ultrasonido y solventes se realizó a través de pulsos, el nivel máximo de extracción de aceite se logró cuando los valores de cantidad de solvente, tiempo de sonicación y potencia acústica fueron de 5 mL g⁻¹, 160 W y 6 h. Sustituyendo estas condiciones en la Ec. 3 se obtiene un nivel de extracción de aceite de 9.25%.

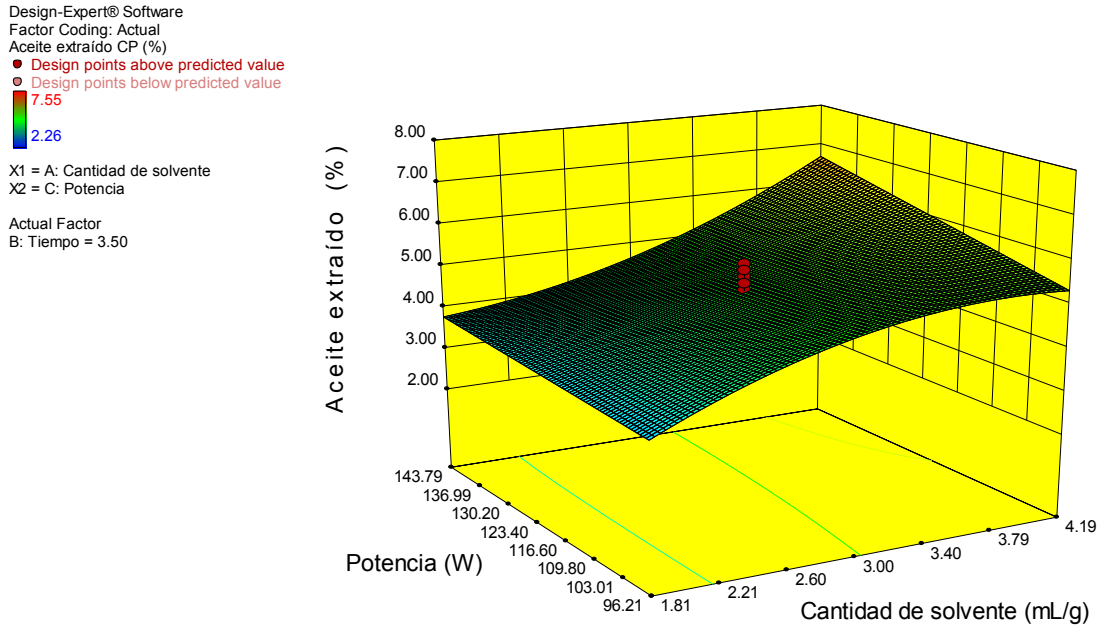


Fig. 2. Efecto de la cantidad de solvente y potencia acústica sobre la cantidad de aceite extraído, utilizando sonicación con pulsos.

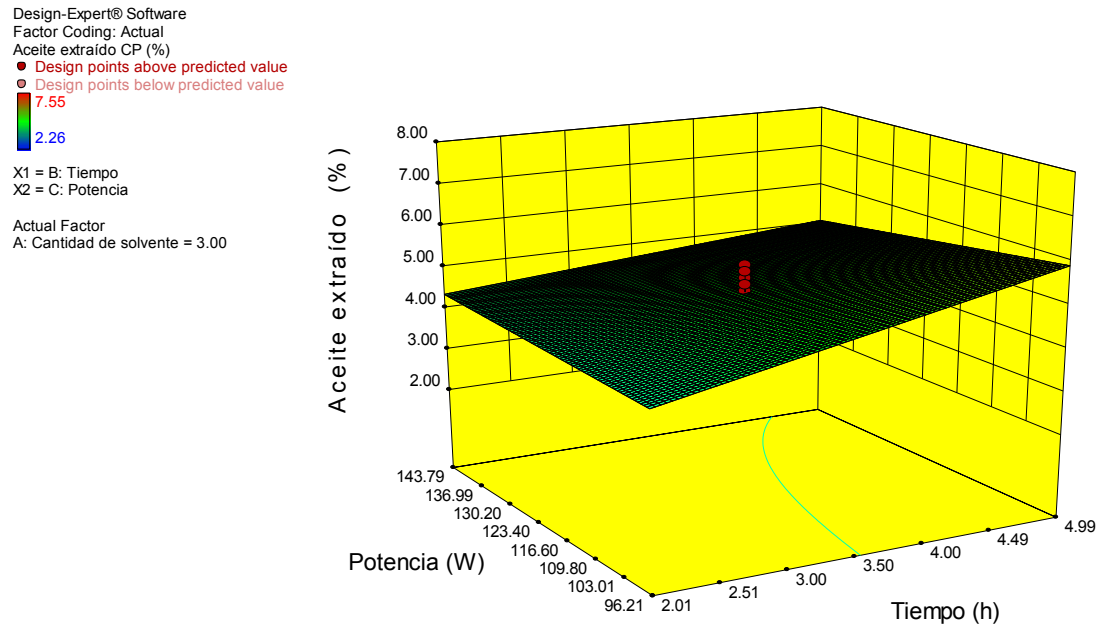


Fig. 3. Efecto de la potencia acústica y tiempo de sonicación sobre la cantidad de aceite extraído, utilizando sonicación con pulsos.

3.2.1.2. Extracción de aceite utilizando sonicación sin pulsos (Y_{SP})

Los valores experimentales de Y_{SP} variaron de 3.67 a 11.16 obteniéndose un modelo de regresión para la

extracción de aceite (Ec. 4). La Tabla 6 muestra el análisis de varianza correspondiente al tratamiento de los datos, aplicando un modelo polinomial de segundo

orden. Se observa que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en dos términos lineales (X_1 , X_2); los términos restantes fueron no significativos ($p > 0.05$).

$$Y_{SP} = -2.844 + 1.116X_1 + 1.261X_2 + 0.027X_3 - 0.194X_1X_2 + 0.002X_1X_3 + 0.005X_2X_3 + 0.152X_1^2 - 0.060X_2^2 - 0.0002X_3^2 \quad (4)$$

Nuevamente se procede a estimar el modelo eliminando los términos no significativos, para obtener un modelo final:

$$Y_{SP} = -3.975 + 2.248X_1 + 1.429X_2 + 0.013X_3 - 0.194X_1X_2 \quad (5)$$

Con una $R^2 = 0.8326$ y donde X_1 , X_2 , son términos significativos. Los términos X_3 y X_1X_2 , a pesar de que forman parte del conjunto de términos no significativos son los que más se aproximan a un valor de significancia y se incluyen con el propósito de observar su contribución.

La Fig. 4 ilustra como la potencia acústica sigue sin tener efecto significativo en la cantidad de aceite extraído aun cuando el proceso se realice sin pulsos. El bajo efecto de la sonicación puede deberse a la alta polaridad de la mezcla cloroformo/metanol, de tal forma que ésta debilita fácilmente la interacción de los lípidos con la estructura celular produciendo rápidamente la solución (McNichol y col., 2012; Ríos y col., 2013). Por otra parte, se observa que la cantidad de aceite extraído está controlado predominantemente por la cantidad de solvente (cloroformo-metanol 2:1)

utilizada por unidad de masa de microalga y en segunda instancia por el tiempo de sonicación. Bajo estas condiciones, el nivel máximo de aceite extraído está determinado por los valores 5 mL/g, 6 h y 160W. Sustituyendo estas condiciones en la Ec. 5 se obtiene un nivel de extracción de aceite de 12.1%. Existen trabajos que demuestran la elevada eficiencia de extracción del método clásico de Bligh y Dyer combinado con la aplicación de ultrasonido (Araujo y col., 2013; Ranjan y col., 2010), sin embargo, estos trabajos se limitan a evaluar varios métodos de estudios a determinadas condiciones y no se hace un análisis para encontrar las mejores condiciones de cada proceso. La sonicación sin pulsos permite exponer a la muestra a un proceso continuo de sonicación por lo que el tiempo efectivo es mayor que en la sonicación con pulsos, aun cuando el tiempo neto de extracción sea el mismo. Es por ello que bajo esta condición continua se observa un proceso mas eficiente de extracción. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otros trabajos en donde la viscosidad de la muestra constituye el factor más significativo o de mayor influencia en la variable de respuesta (Adam y col., 2012). A mayor contenido de agua en la muestra (baja viscosidad) se obtiene mayor cantidad de aceite. Por otro lado, la membrana celular se ve irradiada por ondas acústicas de gran intensidad, que a su vez, son generadas debido al fenómeno de cavitación acústica (producción de gran cantidad de energía por el colapso de microburbujas formadas al seno del solvente).

Tabla 6. Análisis de varianza de los datos experimentales obtenidos con sonicación sin pulsos (modelo de segundo orden)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Fv	p-value
X_1	47.67	1	47.67	36.70	0.0001
X_2	21.72	1	21.72	16.72	0.0022
X_3	1.31	1	1.31	1.01	0.3383
X_1^2	0.67	1	0.67	0.51	0.4898
X_2^2	0.26	1	0.26	0.20	0.6663
X_3^2	0.11	1	0.11	0.085	0.7768
X_1X_2	0.94	1	0.94	0.72	0.4158
X_1X_3	0.021	1	0.021	0.016	0.9006
X_2X_3	0.24	1	0.24	0.19	0.6752
Error total	8.11	5	1.62		
Error corr.	86.04	19			

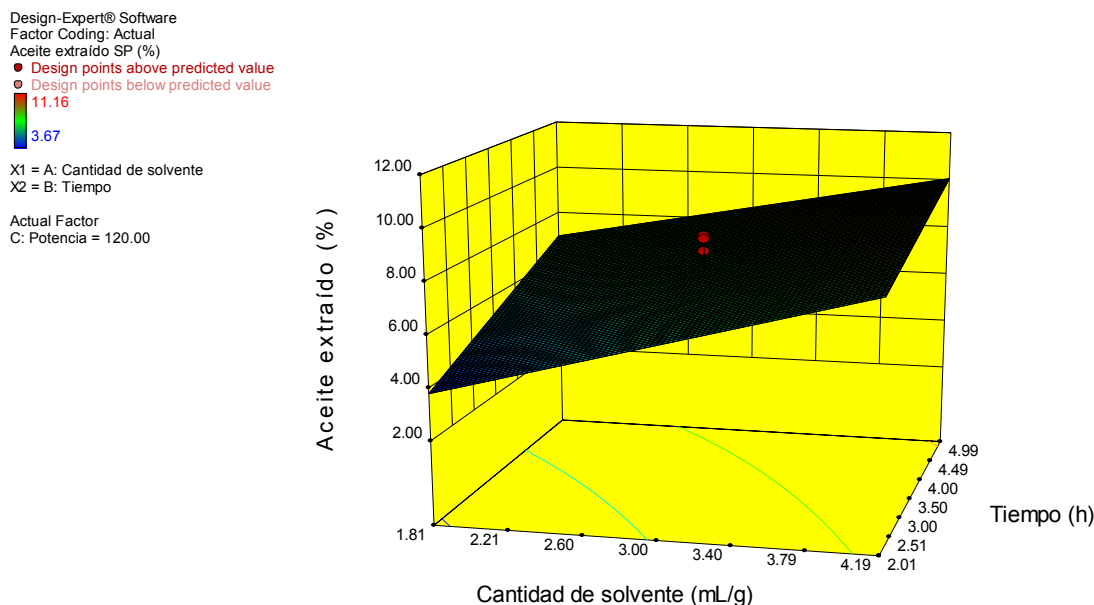


Fig. 4. Efecto de la cantidad de solvente y tiempo de sonicación sobre la cantidad de aceite extraído, utilizando sonicación sin pulsos.

Esta energía es suficientemente alta para llevar a cabo la lisis celular, provocando que el contenido lipídico del citoplasma como de la propia membrana queden expuestas para la acción del solvente facilitándose con esto la extracción (Mason y *col.*, 1996); es decir, aun con valores relativamente bajos de potencia acústica es posible incrementar la proporción de células rotas así como los coeficientes de transferencia de masa en el lavado de estas por el solvente (Ruiz y *col.*, 2011), no observándose, al final, efectos significativos respecto a la potencia acústica utilizada.

3.2.1.3. Eficiencia de extracción de aceite

Para determinar el máximo nivel de extracción de aceite se utilizó el modelo sin pulsos debido a que arrojó los mejores resultados. Tomando en cuenta que el contenido de lípidos base seca de la pasta residual obtenida después de realizarle la extracción de aceite fue de 0.9253%, y en base a los resultados experimentales mostrados en la Tabla 2, se realizan los cálculos siguientes:

Contenido de lípidos, base seca en masa celular *T. Suecica* = [lípidos totales/biomasa seca](100) = $[55.30 \mu\text{g}/298.55 \mu\text{g}](100) = 18.52\%$

Lípidos totales extraídos, base seca = $18.52 - 0.9253 = 17.59\%$

Lípidos no polares (incluye TAG's) = 12.10%

Lípidos polares = $17.59 - 12.10 = 5.49\%$

Eficiencia máxima de extracción de aceite = $[17.59/18.52]100 = 94.98\%$

En consecuencia, el aceite extraído está constituido por un 31.21% de lípidos polares y 68.79% de lípidos no polares los cuales pueden usarse para la producción de biodiesel. Estos resultados no difieren sustancialmente respecto a los obtenidos por (Balasubramanian y *col.*, 2013) quienes trabajaron la extracción de aceite para *Nannochloropsis sp.* a través de un sistema solvente cloroformo/metanol auxiliado con ultrasonido donde obtuvieron una distribución de 37 y 63% de lípidos polares y no polares respectivamente. Asimismo, es importante notar que los lípidos polares extraídos son solubles en la fase metanol-agua, y por tanto, no son considerados para su análisis de composición de la fase orgánica (cloroformo).

3.3 Caracterización de los metilésteres de ácidos grasos

La Figura 5 muestra un cromatograma obtenido del aceite de *Tetraselmis suecica*; se presenta sólo un cromatograma porque no se encontraron diferencias significativas en los perfiles entre tratamientos. En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los metil ésteres identificados; como se observa, *Tetraselmis suecica* está constituida por un 16.79% de ácidos grasos monoinsaturados, 26.02%

Tabla 7. Composición de metil ésteres de ácidos grasos presentes en los productos de reacción (*Tetraselmis suecica*)

Metil éster	Estructura	Composición (%)
Saturados totales		57.19
Palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$ (C16:0)	28.86
Estearico	$C_{18}H_{36}O_2$ (C18:0)	28.33
Monoinsaturados totales		16.79
Oléico	$C_{18}H_{34}O_2$ (C18:1)	16.79
Poliinsaturados totales		26.02
Linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$ (C18:2)	11.71
Linolénico	$C_{18}H_{30}O_2$ (C18:3)	14.31

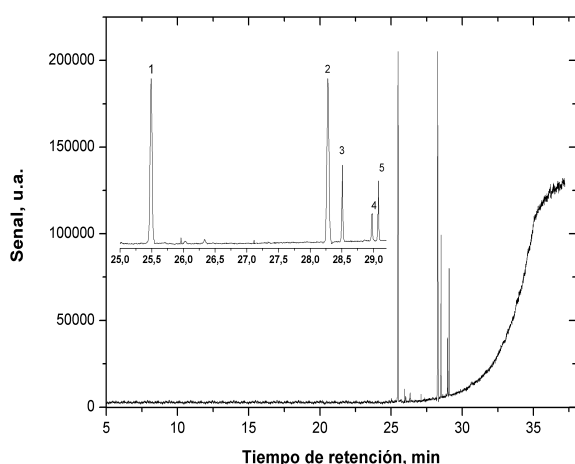


Fig. 5. Cromatograma que muestra los compuestos presentes en la reacción de transesterificación de aceite extraído de *Tetraselmis suecica*. (1) Ácido palmítico metil éster (2) Ácido estearico metil éster (3) Ácido oleico metil éster (4) Ácido linoleico metil éster (5) Ácido linolénico metil éster.

de ácidos grasos poliinsaturados y un 57.19% de saturados. El ácido palmítico metil éster (C16:0) se encontró en mayor proporción con un 28.86%, seguido por el ácido estearico metil éster (C18:0) con un 28.33%, ácido oleico metil éster (C18:1) con un 16.79%, ácido linolénico metil éster (C18:3) con un 14.31% y ácido linoleico metil éster (C18:2) con un 11.71%.

Los compuestos C16:0 y C18:0 pertenecen al grupo de ácidos grasos que normalmente están presentes en las microalgas, independientemente de la especie y de las condiciones de cultivo, mientras que la presencia de C18:1, C18:2 y C18:3 está en función de la especie y condiciones de crecimiento durante el cultivo (Thomas y col., 1983; Amaro

y col., 2011). Tanzi y col., (2013) trabajaron con *Nannochloropsis oculata* y *Dunaliella salina* y reportaron un perfil de ácidos grasos que coincide cualitativamente con los resultados aquí presentados, excepto que en sus trabajos sólo encontraron trazas de C18:0. Por otra parte, Bondioli y col., (2012) obtuvieron un 18.94% de poliinsaturados y un 46.98% en monoinsaturados en *Tetraselmis suecica*; Comparativamente respecto a nuestros resultados, existe una diferencia sustancial en el nivel de monoinsaturados, aunque en poliinsaturados la diferencia no es tan notable.

Conclusiones

En el presente trabajo se encontraron las mejores condiciones del proceso de extracción de lípidos asistido por ultrasonido de *Tetraselmis suecica*, se encontró que los factores que afectan significativamente al proceso son la cantidad de solvente (cloroformo-metanol 2:1) utilizada por unidad de masa de microalga y el tiempo de sonicación, mientras que el efecto de la potencia acústica de las ondas ultrasónicas no resultó significativa en el rango de 80 a 160W, es decir existe suficiente energía para llevar a cabo el rompimiento celular en el intervalo de potencia estudiado; mostrando que las mejores condiciones de extracción de aceite fueron: cantidad de solvente = 5 mL g⁻¹, tiempo de sonicación = 6 h y potencia acústica = 160W; parámetros que aseguran un proceso altamente eficiente, por encima de 94%. Asimismo, se encontró que la disminución de nitrógeno en el medio de cultivo lleva a una ligera disminución en el contenido lipídico, y a una acumulación de carbohidratos.

Agradecimientos

El primer autor agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el doctorado en biotecnología dentro del Programa Regional de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). También se agradece el apoyo económico a la UAS mediante el proyecto PROFAPI 084/2012 y al Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) por el proyecto -F-PROMEP-38/Rev-03 SEP-23-005.

Referencias

- Adam, F., Abert-Vian, M., Peltier, G. y Chemat, F. (2012). 'Solvent-free' ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. *Bioresource Technology* 114, 457-465.
- Alonso, D.L., Belarbi, E.H., Fernández-Sevilla, J.M., Rodríguez-Ruiz, J. y Grima, E.M. (2000). Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* 54, 461-471.
- Amaro, H.M., Guedes, A.C. y Malcata, F.X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy* 88, 3402-3410.
- Andrich, G., Nesti, U., Venturi, F., Zinnai, A. y Fiorentini, R. (2005). Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp. *European Journal of Lipid Science and Technology* 107, 381-386.
- Anzueto, M.A. (2008). *Evaluación del cultivo continuo de tres especies microalgales*. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), México.
- AOAC. (1990). *Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 16th ed., Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Araujo, G.S., Matos, L.J.B., Fernandes, J.O., Cartaxo, S.J.M., Gonçalves, L.R.B., Fernandes, F.A.N. y Farias, W.R.L. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry* 20, 95-98.
- Atkinson, D., Ciotti, B.J. y Montagnes, D.J.S. (2003). Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% degrees C⁻¹. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 2605-2611.
- Azma, M., Mohamed, M.S., Mohamad, R., Rahim, R.A. y Ariff, A.B. (2011). Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 53, 187-195.
- Balasubramanian, R.K., Doan, T.T.Y. y Obbard, J.P. (2013). Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chemical Engineering Journal* 215, 929-936.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.
- Bondioli, P., Della-Bella, L., Rivolta, G., Chini-Zittelli, G., Bassi, N., Rodolfi, L., Casini, D., Prussi, M., Chiaramonti, D. y Tredici, M.R. (2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F& M-M24 and *Tetraselmis suecica* F& M-M33. *Bioresource Technology* 114, 567-572.
- Brown, T.M., Duan, P. y Savage, P.E. (2010). Hydrothermal Liquefaction and Gasification of *Nannochloropsis* sp. *Energy & Fuels* 24, 3639-3646.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294-306.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P. y Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48, 1146-1151.
- De la Guardia, M. y Armenta, S. (2011). Greening sample treatments. En: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Pp. 87-120. Elsevier.

- De la Hoz, S.H., McCaffrey, W.C., Burrell, R.E. y Ben-Zvi, A. (2012). Optimization of microalgal productivity using an adaptive, non-linear model based strategy. *Bioresource Technology* 104, 537-546.
- Du, Z., Li, Y., Wang, X., Wan, Y., Chen, Q., Wang, C., Lin, X., Liu, Y., Chen, P. y Ruan, R. (2011). Microwave-assisted pyrolysis of microalgae for biofuel production. *Bioresource Technology* 102, 4890-4896.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Gong, Y. y Jiang, M. (2011). Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnology Letters* 33, 1269-1284.
- Guillard, R.R. y Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms *Cyclotella nana hustedt* and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8, 229-234.
- Gutiérrez-Pulido, H. y De la Vara-Salazar, R. (2005). *Análisis y Diseño de Experimentos*. 1a Ed., McGraw-Hill Interamericana. México, DF. 414-530.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K. y Webley, P.A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology* 102, 178-185.
- Hemerick, G. (1973). Mass culture. En: *Handbook of Phyological Methods*, Pp. 255-273. Cambridge University Press, London.
- Klok, A.J., Martens, D.E., Wijffels, R.H. y Lamers, P.P. (2013). Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. *Bioresource Technology* 134, 233-243.
- Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y. y Oh, H.M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* 101, s75-s77.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Mason, T.J., Paniwnyk, L. y Lorimer, J.P. (1996). The use of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3, s253-s256.
- Mata, T.M., Martins, A.A. y Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217-32.
- McNichol, J., MacDougall, K.M., Melanson, J.E. y McGinn, P.J. (2012). Suitability of Soxhlet extraction to quantify microalgal fatty acids as determined by comparison with *in situ* transesterification. *Lipids* 47, 195-207.
- Minowa, T., Yokoyama, S.Y., Kishimoto, M. y Okakura, T. (1995). Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel* 74, 1735-1738.
- Montagnes, D.J.S., Kimmance, S.A. y Atkinson D. (2003). Using Q₁₀: Can growth rates increase linearly with temperature? *Aquatic Microbial Ecology* 32, 307-313.
- Montgomery, D.C. (1991). *Design and Analysis of Experiments*. 3a Ed., John Wiley and Sons. Inc. New York, NY, USA. 278-286.
- Pande, S.V., Khan R.P. y Venkitasubramanian, T.A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry* 6, 415-423.
- Patil, P.D., Gude, V.G., Mannarswamy, A., Deng, S., Cooke, P., Munson-McGee, S., Rhodes, I., Lammers, P. y Nirmalakhandan, N. (2011). Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. *Bioresource Technology* 102, 118-122.
- Ranjan, A., Patil, C. y Moholkar, S.V. (2010). Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49, 2979-2985.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd.
- Ríos, S.D., Castañeda, J., Torras, C., Farriol, X. y Salvadó, J. (2013). Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: Screening studies toward

- biodiesel production. *Bioresource Technology* 133, 378-388.
- Ruiz, R.S., Martínez, C. y Vizcarra, M.G. (2011). Modeling conventional and ultrasound-assisted extraction of oil-containing materials. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 387-399.
- Sánchez-García, D., Resendiz-Isidro, A., Villegas-Garrido, T.L., Flores-Ortiz, C.M., Chávez-Gómez, B. y Cristiani-Urbina, E. (2013). Effect of nitrate on lipid production by *T. suecica*, *M. contortum*, and *C. minutissima*. *Central European Journal of Biology* 8, 578-590.
- Sander, K. y Murthy G.S. (2009). Enzymatic degradation of microalgal cell walls. paper no: 096054. 21-24 June. Reno, Nevada: *American Society of Agricultural and Biological Engineers annual international meeting*.
- Soto-Leon, S., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., Cuevas-Rodríguez, E., Sanchez-Castillo, M.A., Guerrero-Fajardo, C. y Contreras-Andrade, I. (2013). Capítulo 14 - Producción de biodiesel y glicerina a partir de *Jatropha curcas*. En: *Cadena agroindustrial de Jatropha curcas: paquetes tecnológicos para el noroeste de México*, Editores: Escoto, L.G., Contreras, I. y Angulo, M.A., Pp. 193-220, Publicia, Alemania.
- Tanzi, C.D., Vian, M.A. y Chemat, F. (2013). New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *Bioresource Technology* 134, 271-275.
- Thomas, W.H., Tornabene, T.G. y Weissman, J. (1983). *Screening for lipid yielding microalgae: activities for 1983*. SERI/STR-231-2207. Disponible en <http://www.nrel.gov/docs/legosti/old/2207.pdf>.
- Thompson, P.A., Guo, M.X. y Harrison, P. (1992). Effects of variation in temperature on the biochemical composition of 8 species of marine-phytoplankton. *Journal of Phycology* 28, 481-488.
- Voltolina, D., Bückle-Ramírez, L.F. y Morales-Guerrero, E.L. (1989). *Manual de Metodologías y Alternativas para el Cultivo de Microalgas*. Centro de Investigación Científica y de educación Superior de Ensenada (CICESE), México.
- Wong, D.M. y Franz, A.K. (2013). A comparison of lipid storage in *Phaeodactylum tricorutum* and *Tetraselmis suecica* using laser scanning confocal microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 95, 122-128.
- Yoo, C., Jun, S.Y., Lee, J.Y., Ahn, C.Y. y Oh, H.M. (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology* 101, s71-s74.