

Cultivo en efluentes urbanos del alga *Scenedesmus quadricauda* (Sphaeropleales: Scenedesmaceae) y su potencial para biodiesel: perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos

Ruth Salomón¹, Marcela Cravero¹, Enrique Rost², Marisa Carstens², Ariel Parra¹ & Isabel Albarracín^{1,3}

1. Laboratorio de Microalgas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew, Chubut. Argentina; acravero@ar.inter.net
2. Dpto. de Ing. Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut. Argentina; erost@unpata.edu.ar
3. Estación de Fotobiología, CONICET, Rawson, Chubut Argentina; fames@ar.inter.net

Recibido 17-II-2014 • Corregido 9-VI-2014 • Aceptado 8-VII-2014

ABSTRACT: Microalgae stand as biodiesel feedstock for high productivity and good quality of lipids. This paper presents the fatty acid methyl ester profile of *Scenedesmus quadricauda*. The culture was grown in Trelew city sewage, Patagonia, Argentina, in 20L at 23±1°C, 12:12 photoperiod, fluorescent lighting tubes at 33µE m⁻²s⁻¹ and agitation by air bubbling. Percentage of fatty acid methyl esters was 7,89%, it was determined by Lepage method. The profile was obtained by gas chromatography. Methyl linolenate (C18: 3) and polyunsaturated (≥4 double bonds) ester fractions were 15,06% and 0,83% respectively. The unsaturation index (0,84) was estimated and some biodiesel parameters were calculated through it: kinematic viscosity (4,68mm s⁻²), iodine value (75,15), cetane number (57,28), cloud point (8,78°C), specific gravity (0,88) and higher heating value (40,01MJ/kg). Linolenic acid ester fraction is above the limit value of EN 14214:2003 (<12%). However, one can modify unsaturation in this strain by varying the temperature. It is also possible to increase the lipid proportion by maintaining the culture at low nitrogen concentration by venting NH₃ to increase pH during photosynthesis.

Key words: biodiesel, microalgae, *Scenedesmus quadricauda*, urban effluents, fatty acid methyl esters.

RESUMEN: Las microalgas se destacan como materia prima para la fabricación de biodiesel por contar con una mejor productividad y calidad de lípidos. Este trabajo presenta el perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos de *Scenedesmus quadricauda*. El cultivo se realizó en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Patagonia, Argentina, en 20L a 23±1°C, fotoperíodo 12:12, iluminación con tubos fluorescentes a 33 µE m⁻²s⁻¹ y agitación mediante burbujeo de aire. Se determinó por el método de Lepage que el porcentaje de ésteres metílicos de los ácidos grasos fue de 7,89%. El perfil se obtuvo por cromatografía en fase gaseosa, siendo el porcentaje de linolenato de metilo (C18:3) 15,06% y de poliinsaturados (≥4 dobles enlaces) 0,83%. Se calculó el índice de insaturación (0,84) estimándose a través de él parámetros del biodiesel: viscosidad cinemática (4,68 mm s⁻²), índice de Yodo (75,15), número de cetanos (57,28), punto de enturbiamiento (8,78°C), gravedad específica (0,88) y densidad energética (40,01MJ/kg). El porcentaje de éster del ácido linolénico se ubicó por encima del valor límite de la EN 14214:2003 (<12%). No obstante esta especie puede modificar su grado de insaturación variando la temperatura del cultivo. También es factible aumentar el porcentaje de lípidos manteniendo el cultivo con baja concentración de nitrógeno por venteo del NH₃ por aumento del pH durante la fotosíntesis.

Palabras claves: biodiesel, microalgas, *Scenedesmus quadricauda*, efluentes urbanos, ésteres metílicos de ácidos grasos.

Por la necesidad de reducir las emisiones de carbono los combustibles líquidos derivados de material vegetal resultan una atractiva fuente de energía alternativa (Amaro, Guedes & Malcata, 2011). En contraposición con otras formas de energía renovable (por ejemplo, eólica, mareomotriz y solar), los biocombustibles líquidos permiten que la energía sea almacenada químicamente, y también ser utilizados en los motores y las infraestructuras

de transporte existentes después de ser mezclados en distintas proporciones con diesel de petróleo (Singh & Gu, 2010).

Los triglicéridos son los componentes de almacenamiento primario de energía (Rawat, Ranjith Kumar, Mutanda & Bux, 2013). Además de renovables, el biodiesel es también no tóxico y biodegradable (Singh & Gu, 2010; Meher, Vidya & Naik, 2006).

El aceite de origen vegetal usado como materia prima se obtiene normalmente de aceite de soja, girasol y otras oleaginosas. Pero estos cultivos tienen varias desventajas: requieren tierras fértiles y la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes para aumentar la productividad. Debido a todo esto, se están desarrollando otras especies, como productoras de biomasa a las que se denominan de segunda y tercera generación. Algunas de ellas son plantas que crecen en tierras semi-áridas, como colza y *Jatropha*. Otras son organismos que se cultivan en medios líquidos, como bacterias, levaduras y microalgas (Lospennato, Sequeira, Beligni & Chamorro, 2012).

Las microalgas han aparecido en los últimos años como recurso potencial de biodiesel dado que el contenido de aceite de una variedad de especies supera al de todas las fuentes vegetales cultivadas actualmente (González & Kafarov, 2009).

Las rápidas tasas de crecimiento, buen contenido de lípidos y la tolerancia a distintas características de aguas residuales, han motivado que el interés en la producción de biomasa algal para obtener biodiesel siga aumentando (Mata, Martins & Caetano, 2010; Brennan & Owende, 2010; Hoekman, Broch, Robbins, Cenicerros & Natarajan, 2012).

La productividad total de una especie algal es el producto del contenido de lípidos y la tasa de crecimiento, variando el porcentaje de lípidos desde menos de 10% a más del 50% en función de las condiciones de cultivo (Griffiths & Harrison, 2009; Hoekman et al., 2012).

Una investigación exhaustiva de las algas como materia prima para biodiesel fue llevada a cabo por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL, 2009), que mantuvo el Programa de Especies Acuáticas desde el año 1978 al 1996. Es una excelente fuente de información acerca de las condiciones de crecimiento, productividades y los perfiles de composición de diversas cepas de algas (Sheehan, Dunahay, Benemann, Roessler & Weissman, 1998).

Actualmente el Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE, 2010) ha reanudado las investigaciones para la producción de biocombustibles a base de microalgas.

A pesar del interés de estos microorganismos como materia prima para biodiesel, hay pocos informes de perfiles lipídicos de ellos. Se sabe que para algunas cepas, los perfiles de composición de ácidos grasos (FA, fatty acids) están altamente influenciados por las condiciones de crecimiento específicas, tales como los niveles de nutrientes, temperaturas e intensidades de luz (Hu et al, 2008; Hoekman et al., 2012; Hempel, Petrick & Behrendt, 2012). Esto complica la definición de un único perfil de

composición para el biodiesel de microalgas, en comparación con el biodiesel a base de aceite vegetal. De los distintos grupos, la mayoría de las especies investigadas como potencial materia prima de biodiesel pertenece a las algas verdes (clorofíceas).

El biodiesel obtenido a partir de microalgas necesita cumplir con estándares existentes según el país. En los Estados Unidos el estándar relevante es el ASTM D6751 (ASTM, American Society of Testing Materials). En la Unión Europea existen estándares separados para el biodiesel destinado al uso de vehículos automotores (EN 14214, EN: European Norm) y para el uso como aceite de calefacción (EN 14213) (Knothe, 2006). El cumplimiento de tales disposiciones precisa de biodiesel enriquecido en ácidos grasos de cadena larga con elevado grado de saturación (preferentemente los ácidos palmitoleico (16:1), oleico (18:1) y mirístico (14:0)) que permitan disminuir las emisiones tóxicas y mejorar las propiedades del biocombustible (número de cetanos, poder calorífico y estabilidad oxidativa) sin comprometer sus características de flujo, viscosidad y lubricidad (Knothe, 2005; Chisti, 2007). El biodiesel se puede usar puro o mezclado con diesel fósil. Debido a la similitud de las propiedades físicas y químicas del diesel fósil con las del biocombustible, su uso no requiere de modificación alguna en los motores diesel convencionales, por lo que puede ser empleado en éstos ya sea directamente (B100) o en mezclas biodiesel- petrodiesel al 2% (B2), 5% (B5) y 20% (B20) (Al-Zuhair, 2007; Liu & Zhao, 2007; Vasudevan & Briggs, 2008; Fernando & Hanna, 2004; Hoekman et al., 2012).

En este trabajo se informan los resultados del perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos de *S. quadricauda* cultivada en efluentes domiciliarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de biomasa: El cultivo se realizó en efluente cloacal de la ciudad de Trelew, Patagonia, Argentina, en una escala de 20L a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo 12:12, iluminación con tubos fluorescentes a $33\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y agitación mediante burbujeo de aire. Después de 20 días de crecimiento se procedió a la separación de la biomasa algal mediante las operaciones: decantación (autofloculación), extracción del sobrenadante por sifonado y centrifugación. Se determinó la masa seca y la masa seca libre de cenizas (APHA, 1992).

Determinación de ácidos grasos: Se utilizó el método ácido de transesterificación directa propuesto por Lepage y Roy (1986) con cloruro de acetilo/metanol (1:20 v/v). Se obtuvieron los ácidos grasos transesterificados, directamente desde la biomasa. Estos ésteres metílicos

de ácidos grasos, FAMES (Fatty Acid Methyl Esters), fueron separados con hexano y analizados por cromatografía gaseosa.

Para la determinación cromatográfica de los ácidos grasos esterificados se empleó un equipo Hewlett Packard 5890, con detector de ionización de llama, FID (Flame Ionization Detector), y una columna capilar ThermoScientific TR-FAME de 30m de longitud, 0,25mm de diámetro y 0,25µm de espesor de película. Las condiciones del análisis fueron: temperatura inicial del horno 150°C durante 2min, gradiente de 8°C/min hasta 180°C (0min), rampa de 2°C/min hasta 200°C sin permanencia en la temperatura final. El gas portador fue helio, con un caudal de 25mL/min, y "split" de 1/25 y las temperaturas del puerto de inyección y del detector fueron de 250 y 260°C, respectivamente.

La determinación cuantitativa de ácidos grasos se realizó por triplicado empleando ácido heptadecanoico (17:0) de Sigma como patrón interno. Fue agregado a la muestra 0,125 mg del mismo en aproximadamente 10mg de biomasa deshidratada, antes del proceso de esterificación metílica.

Para la identificación de los ácidos grasos se dispuso de mezclas patrón certificadas provistas por Supelco (la N° 19819 denominada FAME 36) y de Nu-Chek (FAMES GLC-569).

Análisis estadístico: Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS versión 11.0, (Chicago, IL). Se calcularon la media y la desviación estándar (n=3) para todos los casos.

Calidad del biodiesel: Se determinaron mediante ecuaciones empíricas los siguientes parámetros de calidad del biodiesel contenidos en las especificaciones estándar de biodiesel (B100, es decir, biodiesel al 100%), tales como la ASTM D6751 en los EEUU, la EN 14214 (2008) en Europa y Resolución S.E. 1283/2006 en Argentina:

- Número de cetano, CN (Cetane number).
- Índice de yodo, IV (Iodine value).
- Viscosidad cinemática.
- Densidad.
- Poder calorífico o densidad energética, HHV (Higher Heating Value).
- Punto de enturbiamiento o punto de nube, CP (Cloud Point).

- Punto de taponamiento de filtro en frío, CFPP (Cold Filter Plugging Point).

Estas propiedades pudieron calcularse en gran parte mediante ecuaciones empíricas basadas en el perfil de ésteres de ácidos grasos. Hay dos factores que son especialmente influyentes en alguna de ellas como es el grado de insaturación (DU, Degree of Unsaturation) y el Factor de cadena larga saturada (LCSF, Long Chain Saturated Factor).

Se calculó el DU multiplicando la fracción en masa de cada componente insaturado por el número de dobles enlaces carbono-carbono que contiene y sumando para todo el perfil. A partir de este índice se estimaron propiedades del biodiesel utilizando las correlaciones halladas por Hoekman et al (2012) para los aceites de diversas fuentes:

- $IV = 74,373 (DU) + 12,71$
- $CN = - 6,6684 (DU) + 62,876$
- Viscosidad cinemática a 40° C (mm²/s) = $-0,6316 (DU) + 5,2065$
- Densidad (g/mL) = $0,0055 (DU) + 0,8726$
- HHV (MJ/kg) = $1,7601 (DU) + 38,534$
- CP (°C) = $- 13,356 (DU) + 19,994$

El IV de los aceites de la microalga también se calculó de acuerdo con la práctica recomendada por AOCS (American Oil Chemists Society) Cd 1c-85 (ISO 2011). Este método estima los gramos de halógeno absorbidos por cada 100 g de lípidos:

Para triglicéridos (TG):

$$IV = (C_{16:1} \cdot 0,950) + (C_{18:1} \cdot 0,860) + (C_{18:2} \cdot 1,732) + (C_{18:3} \cdot 2,616) + (C_{20:1} \cdot 0,785) + (C_{22:1} \cdot 0,723)$$

Para ácidos grasos (FA):

$$IV = (C_{16:1} \cdot 0,9976) + (C_{18:1} \cdot 0,8986) + (C_{18:2} \cdot 1,810) + (C_{18:3} \cdot 2,735) + (C_{20:1} \cdot 0,8175) + (C_{22:1} \cdot 0,7497)$$

Siendo C_{16:1}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{20:1} y C_{22:1} los porcentajes en peso de cada uno de los ácidos grasos.

El factor de cadena larga saturada (LCSF) se obtuvo teniendo en cuenta la composición de los ácidos grasos para calcular el punto de taponamiento de filtro en frío

(CFPP) utilizando la correlación obtenida por Ramos et al (2009):

$$\text{LCSF} = (0,1 \cdot C_{16:0}) + (0,5 \cdot C_{18:0}) + (1 \cdot C_{20:0}) + (1,5 \cdot C_{22:0}) + (2 \cdot C_{24:0})$$

$$\text{CFPP } (^\circ\text{C}) = (3,1417 \cdot \text{LCSF}) - 16,477$$

RESULTADOS

Obtención de biomasa: La concentración algal en masa seca libre de cenizas resultó de $0,392 \text{ gL}^{-1}$.

Determinación de ácidos grasos: El porcentaje de éster metílico de ácidos grasos con respecto a la biomasa seca procesada fue de $7,89 \pm 0,64\%$.

La Fig. 1 grafica la corrida cromatográfica de la muestra. Se observa que al menos cinco especies químicas no pudieron ser identificadas con los patrones utilizados, pero que están presentes en cantidades importantes, en los tiempos de elución: 1,86; 4,95; 5,57; 5,77 y 7,95. En el Cuadro 1 quedaron incluidas en OTROS.

Observación: por simplicidad en la redacción y su lectura, cuando en el texto se indica un ácido graso se refiere a su éster metílico.

La composición de ácidos grasos por grado de saturación se refleja en el Cuadro 1.

El porcentaje de ésteres de ácidos grasos saturados, SFAs, (25,31%) fue mayor que los de ésteres de ácidos grasos monoinsaturados, MUFAs, (11,54%) mientras que el valor de los ésteres de ácidos grasos poliinsaturados, PUFAs, fue de 28,12%.

El ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0) fueron los más abundantes dentro de los saturados con 15,87% y 5,23% respectivamente. Por otra parte, el resto de los saturados, juntos representaron el 4,21%.

El ácido oleico (C18:1n-9cis) con 8,66% fue el MUFA predominante. Por otra parte, los otros, juntos representaron el 2,88%.

Los PUFAs se componen esencialmente de ácido linoleico (C18:2n6) y el ácido α -linolénico (C18:3n3) con 11,94% y 13,22% respectivamente.

El porcentaje de ácidos α y γ linolénico (C18:3) fue de 14,56 %.

Calidad del biodiesel: El índice de insaturación fue de 0,87, valor importante para estimar algunas propiedades del biodiesel, tales como: número de cetanos, Índice de Yodo, viscosidad, densidad, densidad energética y punto de enturbiamiento. El factor de cadena larga saturada fue de 5,76 y con él se estimó el punto de taponamiento de filtro en frío. El Cuadro 2 resume los valores obtenidos para las propiedades del biodiesel y de los estándares de calidad.

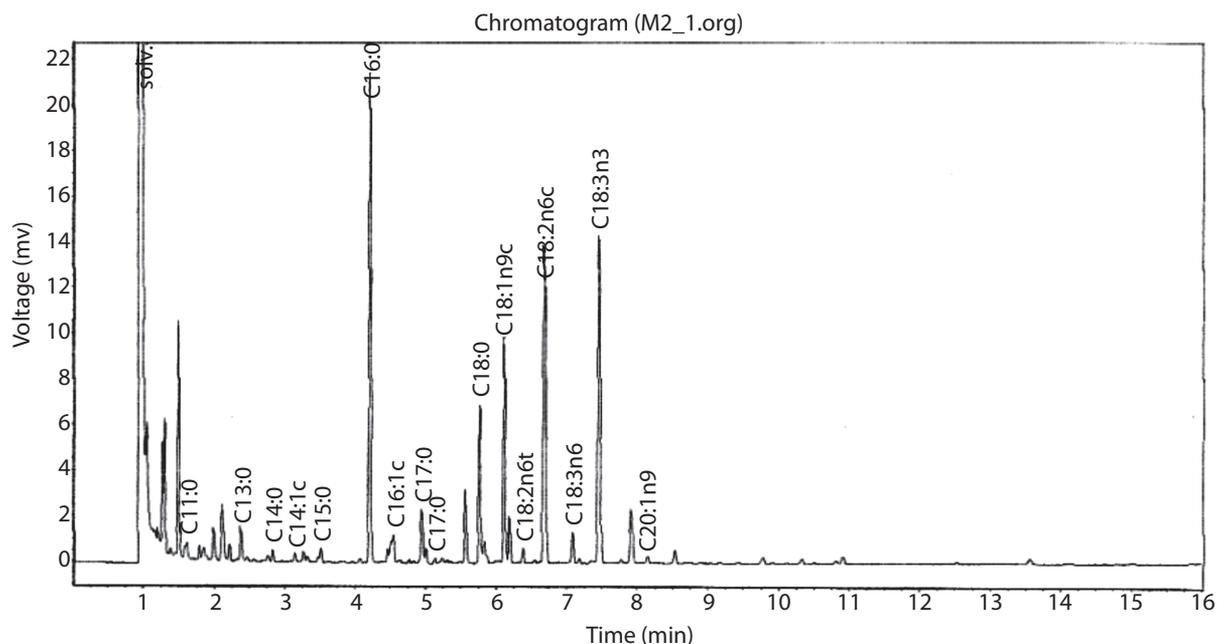


Fig. 1. Cromatograma de la muestra corrida.

CUADRO 1
Composición de ácidos grasos (ordenados por grado de saturación).

Ácido graso	Composición	Desv. estándar
SFAs		
caprílico	C8:0	0,24
undecanoico	C11:0	0,78
láurico	C12:0	0,87
tridecanoico	C13:0	0,05
mirístico	C14:0	0,37
pentadecanoico	C15:0	0,43
palmítico	C16:0	15,87
heptadecanoico (patrón interno)	C17:0	0,51
esteárico	C18:0	5,23
araquídico	C20:0	0,21
behénico	C22:0	0,31
tricosanoico	C23:0	0,00
lignocérico	C24:0	0,44
MUFAs		
miristelaídico	C14:1t	0,03
miristoleico	C14:1	0,35
cis-10-pentadecenoico	C15:1	0,06
palmitelaídico	C16:1t	0,04
palmitoleico	C16:1	1,42
cis-10-heptadecenoico	C17:1	0,11
elaídico	C18:1n9t	0,22
oleico	C18:1n9	8,66
gadoleico	C20:1n9	0,32
erúcico	C22:1n9	0,23
nervónico	C24:1n9	0,09
PUFAs		
linoleídico	C18:2n6t	0,63
linoleico	C18:2n6	11,94
γ-linolénico	C18:3n6	1,34
α-linolénico	C18:3n3	13,22
dihomo-γ-linolénico	C20:3n6	0,08
araquidónico	C20:4n6	0,35
cis-11,14,17-eicosatrienoico	C20:3n3	0,07
cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA)	C20:5n3	0,45
cis-13,16-docosadienoico	C22:2	0,05
otros		35,02
<hr/>		
SFAs (%)		25,31
MUFAs (%)		11,54
PUFAs (%)		28,12
OTROS(%)		35,02

CUADRO 2
Parámetros calculados y estándares de calidad de biodiesel (B100).

Parámetro	Según Hoeckman (2012)	Según AOCS	Según Ramos (2009)	S.E. 1283 Arg.	ASTM D6751 EEUU	EN 14214 U.E
Número de cetanos	57,07			≥45	≥47	≥51
Índice de Yodo (g ₂ /100g)	77,50	69,30(TG) y 72,44(FA)		<135		< 120
Viscosidad cinemática(mm ² s ⁻¹)	4,66			3,5-5	3,5-5	1,9-6
Densidad (g/mL)	0,88			0,875-0,900	0,86-0,90	
Densidad energética (MJ/kg)	40,07					
Punto de enturbiamiento(°C)	8,36					
Punto de taponamiento de filtro en frío(°C)			1,61			

DISCUSIÓN

La concentración algal en masa seca libre de cenizas se considera un valor aceptable dado que es similar a la DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) del efluente utilizado, que corresponde a uno de carga media (Oswald, 1988; Salomón et al., 2012).

El porcentaje de éster metílico de ácidos grasos con respecto a la biomasa seca procesada fue de 7,89 ± 0,64% lo que proporciona la cantidad de sustrato para la producción de biodiesel por transesterificación, valor superior al reportado por Lee, Yoo, Jun, Ahn y Oh (2010) que obtuvieron 1,88% para *S. quadricauda*.

El porcentaje de ácidos α- y γ-linolénico (C18:3) fue de 14,56 % levemente por encima de la especificación EN 14214 que indica para el uso de vehículos un máximo de 12% en peso. Sin embargo mostró niveles totales de ésteres metílicos con cuatro o más dobles enlaces (eicosapentaenoico: 0,45% y araquidónico: 0,35%) por debajo del límite requerido (máximo de 1% en peso en EN 14214).

Varios investigadores han estudiado relaciones entre las propiedades y la composición de ácidos grasos utilizando compuestos puros o mezclas de compuestos puros (Knothe, 2005; Chuck et al., 2009). Hoekman et al. (2012) recopilaron información que les permitieron demostrar una alta correlación entre el índice de insaturación y algunas propiedades del biodiesel.

El **Índice de Yodo** dio como resultado 77,50g I₂/100g aplicando la ecuación de Hoekman, y de acuerdo al Método AOCS, los valores de 69,30g I₂/100g (para triglicéridos) y 72,44g I₂/100g (para ácidos grasos libres). Por ambos métodos, se obtuvieron resultados similares, lo que nos permite utilizar el DU a pesar de que en el análisis cromatográfico se obtuvo un porcentaje alto (>30%) de ácidos grasos que no pudieron ser

identificados. Los valores de IV así calculados resultaron inferiores a los máximos permitidos por el estándar argentino (135g I₂/100g) y el europeo (120g I₂/100g; CEN EN-14214).

El número de **cetanos** es el principal indicador de la calidad del biodiesel y depende de la longitud y saturación de la cadena de los ácidos grasos. El valor obtenido fue de 57,07 cumpliendo con las normas para biodiesel que indican un mínimo de 45 en la Res. SE 1283 de Argentina, 51 en la norma EN 14214 y de 47 en la norma ASTM D6751.

Como ya se mencionó, los principales ácidos grasos saturados en la microalga estudiada fueron el ácido palmítico C16:0 (15,87%) y esteárico C18:0 (5,23%), valores cercanos al aceite de soja que tiene un CN entre 48-56 (Knothe, 2008), valores cercanos al estimado.

La **viscosidad cinemática** calculada fue de 4,66mm² s⁻¹, valor enmarcado dentro de la normativa para biodiesel (3,5-5mm² s⁻¹ para ASTM D6751, S.E. 1283 y 1,9-6mm² s⁻¹ para EN 14214, todos a 40°C).

La **densidad** calculada fue de 0,88g/mL, valor incluido dentro de las normas (0,875-0,9g/mL en S.E. 1283 y 0,86-0,9g/mL en ASTM D6751). Esta es una propiedad clave para el rendimiento del motor.

La **densidad energética** no se especifica en las normas de biodiesel S.E. 1283, ASTM D6751 ni en EN 14214. Sin embargo, una norma europea para el uso de biodiesel como combustible para calefacción, EN 14213, especifica un valor mínimo de 35 MJ/kg. Para el gasoil diesel es de 43MJ/kg y 37MJ/kg para el metil éster del aceite de colza. El valor calculado de densidad energética fue de 40,07MJ/kg, dato muy interesante a la hora de evaluar las mezclas de biocombustibles a fin de evitar una disminución muy marcada en la densidad energética de las mismas. El marco legal en Argentina es la Ley 26 093

y Decreto 109/2007 que indica que los combustibles líquidos caracterizados como nafta por un lado y gasoil o diesel oil por el otro, que se comercialicen dentro del territorio nacional, deberán mezclarse en las instalaciones habilitadas a tal fin, con un porcentaje de al menos el 5 % de Bioetanol (E5) y Biodiesel (B5) respectivamente, medido sobre la cantidad del producto final (Arts. 7 y 8).

A partir del año 2013 el gobierno decidió aumentar el corte de biodiesel en el gasoil al 10%.

Parámetros como la **temperatura de enturbiamiento (CP)** y el **punto de obstrucción de filtro en frío (CFPP)** se utilizan para evaluar las propiedades de flujo en frío del diesel y biodiesel estando altamente correlacionadas entre sí, lo que sugiere que cualquiera podría ser utilizada como un indicador de la otra (Knothe, 2008). En las normas existentes (tanto en Argentina, EE.UU. y Europa) no se incluyen especificaciones explícitas para estas propiedades, sin embargo, generalmente se requiere que el proveedor de combustible indique las propiedades de flujo en frío, informando el punto de obstrucción de filtro en frío del combustible (NREL, 2009). Según la correlación con el DU se estimó el punto de enturbiamiento en 8,36°C y con el factor de cadena larga saturada (LCSF), el punto de obturación de filtro en frío en 1,61°C.

El biodiesel procedente de aceites con altas cantidades de ácidos grasos de cadena larga saturada tiende a tener relativamente propiedades pobres de flujo en frío (Hoekman et al., 2012).

La microalga en estudio contiene una mayor cantidad de la combinación de ácidos palmítico y esteárico (21,10%) que el aceite de soja pero una cantidad menor que el aceite de palma. El aceite de soja tiene aproximadamente el 10-11% de palmítico y de esteárico 4-5% y el aceite de palma cuenta con aproximadamente 40-47% de palmítico y 3-6% de ácido esteárico (Knothe, 2008). Los ésteres metílicos de soja y de palma tienen un punto de enturbiamiento de -2°C a 3°C (Knothe, 2008) y de 10°C a 16°C (Imahara, Minami & Saka, 2006), respectivamente. Con respecto al punto de obturación en frío el aceite de palma tiene un punto de 10°C y el de soja de -5°C (Ramos, Fernández, Casas, Rodríguez & Pérez, 2009). El biodiesel de *S. quadricauda* con valores intermedios de ácido palmítico C16:0 (15,87%) y esteárico C18:0 (5,23%), tiene un valor de punto de enturbiamiento y de obturación en frío intermedio de 8,36°C y 1,61°C respectivamente.

Si bien el límite en el CP y CFPP no está indicado en las especificaciones de las normas para el biodiesel existe un acuerdo según las condiciones climáticas de cada país (Knothe, 2005).

Se puede decir que a pesar de que el porcentaje de éster del ácido linoléico se ubica por encima del valor

límite de una de las especificaciones internacionales, la EN 14214 (<12%), *S. quadricauda* mostró su potencialidad como materia prima para la producción de biodiesel, ya que estos microorganismos pueden modificar su DU variando la temperatura del cultivo. Por ejemplo, Hempel et al. (2012) trabajando con *Chlorella* sp reportaron que al aumentar la temperatura del cultivo de 15°C a 35°C el contenido de ácido α -linoléico (C18:3 ω 3) disminuyó de 23,4 a 6,2%, el contenido de ácido linoleico (C18:2 ω 6) y el de ácido palmítico (16:0) se incrementaron de 34 a 39,1% y de 24,9 a 40,7% respectivamente, manteniéndose el contenido de los otros FA casi constante. En tanto, Xin, Hong-ying y Yu-ping (2011) observaron en cultivos de *Scenedesmus* sp que a medida que se aumentaba la temperatura de 10 a 30°C la suma de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados iba en aumento y la de poliinsaturados disminuía. Esto implica que el biodiesel obtenido de esta microalga es adecuado para ser utilizado en zonas frías o templadas de acuerdo con la temperatura de cultivo bajo las cuales se obtiene la materia prima.

También hay variaciones en el DU cuando se cultivan en medios con deficiencia de nitrógeno. Do Nascimento et al. (2012) trabajaron con distintas cepas de *Scenedesmus* utilizando medio BG11 con 1mM de NH_4Cl (deficiente en nitrógeno) y con 4mM de NH_4Cl (suficiente en nitrógeno), informando una disminución entre el 50 y 67% del ácido linoléico en los cultivos con deficiencia de nitrógeno. Esta condición, en el caso de efluente cloacal se puede lograr por el venteo del NH_3 aumentando el pH durante la fotosíntesis, ya que éstos contienen mayormente nitrógeno amoniacal.

Los resultados de este estudio demuestran que es factible obtener materia prima de calidad a partir de *Scenedesmus quadricauda* cultivada en efluente cloacal para obtención de biodiesel. Esta información básica, es útil para ampliar las investigaciones tendientes a buscar las condiciones más adecuadas que lleven a mejorar la calidad de los ésteres de ácidos grasos.

En la provincia del Chubut no se registran antecedentes desde el punto de vista científico por lo que reconociendo las valiosas propiedades de las microalgas, este trabajo es un aporte a las bases técnicas necesarias para que estos microorganismos se constituyan en un cultivo industrial como recurso alternativo en el campo energético.

AGRADECIMIENTOS

El financiamiento económico de este proyecto fue provisto por el Consejo Federal de Ciencia y Tecnología dependiente del Ministerio de Ciencia,

Tecnología e Innovación Productiva, mediante convocatoria a Proyectos Federales de Innovación Productiva (PFIP 2007).

REFERENCIAS

- Al-Zuhair, S. (2007). Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels. Bioproducts. Biorefineries*, 1, 57-66.
- Amaro, H. M., Guedes, A. C., & Malcata, F. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88, 3402-3410.
- APHA, AWWA, WPCF. (1992). *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.
- ASTM D6751. (2012). *Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels*. Recuperado de <http://www.astm.org/Standards/D6751.htm>.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- Chuck, C. J., Bannister, C. D., Hawley, J. G., Davidson, M. G., La Bruna, I., & Paine, A. (2009). Predictive model to assess the molecular structure of biodiesel fuel. *Energy and Fuels*, 23(4), 2290-2294.
- Department of Energy. DOE. (2010). *Energy Biomass Program. National algal biofuels technology roadmap*. Office of Energy Efficiency and Renewable U.S. Recuperado de <http://www.map.eren21.net>
- Do Nascimento, M., Ortiz-Marquez, J. C. F., Sanchez-Rizza, L., Echarte, M., & Curatti, L. (2012). Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from South-Eastern Buenos Aires, Argentina. *Bioresource Technology*, 125, 283-290.
- EN 14214. (2003). *Automotive Fuels, Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines, Requirements and Test Methods*. Recuperado de <http://www.aascarburants.com/assets/files/pdf/Biodiesel-EN14214.pdf>
- Fernando, S., & Hanna, M. (2004). Development of a Novel Biofuel Blend Using Ethanol-Biodiesel-Diesel Microemulsions: EB-Diesel. *Energy & Fuels*, 18, 1695-1703.
- González, A., & Kafarov, V. (2009). Producción de biocombustibles de tercera generación: extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. En *Memorias del IV Simposio de Química Aplicada*. Colombia: SIQUIA.
- Griffiths M. J., & Harrison, S. T. L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493-507.
- Hempel, N., Petrick, I., & Behrendt, F. (2012). Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1407-1418.
- Hoekman, S. K., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., & Natarajan, M. (2012). Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 143-169.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54, 621-639.
- Imahara, H., Minami, E., & Saka, S. (2006). Thermodynamic study on cloud point of biodiesel with its fatty acid composition. *Fuel*, 85(12-13), 1666-1670.
- ISO/CD 3961 ISO TC 34/SC 11 N 11/WG. (2011). *Animal and vegetable fats and oils. Determination of iodine value*. Recuperado de http://www.iso.org/iso/home/standards_development/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=47936
- Knothe, G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technology*, 86, 1059-1070.
- Knothe, G. (2006). Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83, (10), 823-833.
- Knothe, G. (2008). "Designer" Biodiesel: Optimizing Fatty Ester Composition to Improve Fuel Properties. *Energy & Fuels*, 22, 1358-1364.
- Lepage, G., & Roy, C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipids Research. Notes on Methodology*, 27, 114-120.
- Lee, J., Yoo, C., Jun, S., Ahn, C., & Oh, H. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101, S75-S77.
- Liu, B., & Zhao, Z. (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal Chem. Technology Biotechnology*, 82, 775-780.
- Lospennato, M., Sequeira, A., Beligni, M. V., & Chamorro; E. (2012). *Nannochloropsis oculata*: Evaluación de métodos de extracción de triglicéridos saponificables para la apropiación industrial. En *II Jornadas de Investigación en Ingeniería del NEA y Países Limítrofes*. Resistencia: Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional Resistencia.
- Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 10 National Renewable Energy Laboratory (NREL). (2009). *Biodiesel handling and use guide –fourth edition*. (Report NREL/TP-540-43672). Recuperado de: <http://www.biodiesel.org/docs/using-hotline/nrel-handling-and-use.pdf?sfvrsn=4>

- Oswald, W. J. (1988). Micro-Algae and waste-water treatment. En Borowitzka, M. A., & Borowitzka, L. J. (Eds.), *Microalgal Biotechnology* (305-328). Cambridge: University press.
- Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L., & Pérez, A. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, *100*, 261–268.
- 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.
- Salomón, R., Albarracín, I., Cravero, M., Parra, A., Quintero, R., García, D., & Obholz, D. (2012). Depuración de efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina con la microalga *Scenedesmus quadricauda* en 30 litros. En Rodríguez, M.E. (Ed.), *IV Congreso Internacional de Gestión y Tratamiento Integral del Agua* (196-204). Córdoba: Fundación ProDTI.
- Secretaría de Energía SE 1283/2006. (2006). *Las especificaciones que deberán cumplir los combustibles que se comercialicen para consumo en el Territorio Nacional*, (Official Journal No. 30.991, 15 September 2006). Recuperado de <http://www.dieselnet.com/standards/ar/fuel.php>
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., & Weissman, J. C. (1998). *A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from algae*. (Report NREL/TP-580-24190) Golden CO: National Renewable Energy Laboratory. Recuperado de www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf
- Singh, J., & Gu, S. (2010). Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 2596–2610.
- Vasudevan, P. T., & Briggs, M. (2008). Biodiesel production – current state of the art and challenges. *Journal Ind. Microbiol. Biotechnology*, *35*, 421-430.
- Xin, L., Hong-ying, H., & Yu-ping, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, *102*, 3098–3102.

