

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**BIORREFINERÍA PARA LA VALORIZACIÓN SOSTENIBLE DE LA BIOMASA DE  
*A. platensis* EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INGENIERÍA EN BIOSISTEMAS**

PRESENTA:  
**ING. JESÚS ALBERTO LARA REYES**

GENERAL ESCOBEDO, N.L.

NOVIEMBRE DE 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**BIORREFINERÍA PARA LA VALORIZACIÓN SOSTENIBLE DE LA BIOMASA DE  
*A. platensis* EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INGENIERÍA EN BIOSISTEMAS**

PRESENTA:  
**ING. JESÚS ALBERTO LARA REYES**

GENERAL ESCOBEDO, N.L.

NOVIEMBRE DE 2025

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO(A) EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INGENIERÍA EN BIOSISTEMAS

COMITÉ PARTICULAR

Celestino García Gómez

Dr. Celestino Gómez García  
Director de Tesis



Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy  
Codirectora

Héctor Flores Breceda

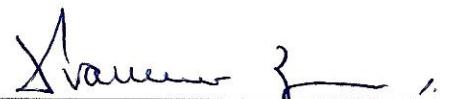
Dr. Héctor Flores Breceda  
Asesor

Francisco Zavala García

Dr. Francisco Zavala García  
Subdirector de Posgrado e Investigación

ESTA TESIS FUE APROBADA EN FORMATO, POR EL COMITÉ DE POSGRADO,  
ATENDIENDO A EL ARTÍCULO 123, DEL REGLAMENTO GENERAL DEL  
SISTEMA DE POSGRADO DE LA UANL.

COMITÉ DE POSGRADO



Ph. D. Francisco Zavala García  
Presidente



Dra. Nelly Cristina Ramírez Grimaldo  
Secretaria



Dra. Lidia Rosaura Salas Cruz  
Vocal

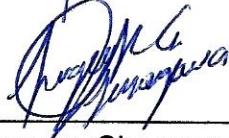


Ph.D. Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado

Vocal



Ph.D. Emilio Olivares Sáenz  
Vocal



Dra. Sugey Ramona Sinagawa García  
Vocal



Dr. Guillermo Niño Medina  
Vocal

## **DEDICATORIA**

A mis asesores el Dr. Celestino, la Dra. Rocío, El M.C. Carlos y todos los maestros que me han apoyado, por su guía, paciencia y enseñanzas. Cada uno de ustedes ha dejado una huella en mi formación, no solo académica, sino también humana. Gracias por inspirarme a seguir aprendiendo y por compartir conmigo su experiencia.

A mi madre, mi familia, pilares fundamentales en esta etapa y en todas las demás. Gracias por su amor incondicional, su comprensión, por animarme en los días difíciles y celebrar conmigo cada logro. Sin su apoyo constante, este camino habría sido mucho más difícil.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, con quienes compartí largas jornadas de trabajo, dudas, descubrimientos, risas (más risas que descubrimientos) y aprendizajes. Gracias por el compañerismo, el apoyo mutuo y por ayudarme a disfrutar cada parte del proceso.

Y finalmente, a toda la gente que me apoyó de una u otra forma, gracias por sus palabras de aliento, su tiempo y su confianza. Cada gesto de apoyo ha sido una motivación más para seguir adelante.

A todos ustedes, esta meta también les pertenece.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco profundamente a la Universidad Autónoma de Nuevo León, por ser el espacio donde pude desarrollarme académica y personalmente, y por brindarme las herramientas necesarias para crecer como profesional comprometido con la sustentabilidad y el cuidado del medio ambiente.

A la Facultad de Agronomía, por abrirme las puertas a un campo de conocimiento apasionante, por el acompañamiento constante y por fomentar una visión integral de la ciencia aplicada al bienestar social y ambiental.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por el respaldo y la confianza en la formación de investigadores comprometidos con el desarrollo. Su apoyo ha sido esencial para hacer realidad este proyecto.

Al Laboratorio de Remediación Ambiental, por brindarme el espacio para experimentar, aprender y crecer. Gracias por ser el escenario donde la teoría se convirtió en práctica y por permitirme ser parte de un equipo comprometido con la ciencia aplicada a la solución de problemas reales.

A la Administración de la Facultad de Agronomía, por su gestión, disposición y apoyo continuo para facilitar los procesos académicos y de investigación. Su trabajo es clave para que proyectos como este puedan llevarse a cabo de manera eficiente.

## INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
RESUMEN .....	13
ABSTRACT .....	14
INTRODUCCIÓN .....	15
HIPÓTESIS .....	19
OBJETIVOS .....	20
1.1 Objetivo General .....	20
1.1.1 Objetivos Específicos .....	20
REVISIÓN DE LITERATURA .....	21
2.1. La Crisis Hídrica .....	21
2.1.1. El Problema del Estrés Hídrico y la Seguridad Hídrica .....	23
2.1.2. Crisis Hídrica en Nuevo León .....	23
2.1.3. Agua de Rechazo de Ósmosis Inversa .....	24
2.2. Bioetanol como Alternativa Energética y Sustentable .....	26
2.2.1. Importancia del Bioetanol en la Transición Energética .....	26
2.2.2. Producción de Bioetanol a partir de Microalgas .....	28
2.2.3. Métodos de Producción de Bioetanol .....	31
2.3. Microalgas como Materia Prima para Bioetanol .....	34
2.3.1. Producción de Bioetanol a partir de <i>A. platensis</i> .....	34
2.3.2. Optimización del Cultivo de <i>A. platensis</i> .....	35
2.4. Métodos de Extracción y Cuantificación de Carbohidratos .....	36
2.4.1. Métodos de Extracción de Carbohidratos en Microalgas .....	36
2.4.2. Métodos de Cuantificación de Carbohidratos .....	37
2.5. Optimización de la Fermentación para la Producción de Bioetanol .....	38
2.5.1. Factores que Afectan la Fermentación .....	38
2.5.2. Métodos de Optimización de la Fermentación .....	39
MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
3.1. Diseño del Estudio .....	41

3.1.1. Ubicación del Experimento .....	41
3.1.2. Origen del Agua .....	41
3.1.3. Selección de Cepa.....	41
3.1.4. obtención de las Cepas .....	41
3.2. Cultivo de <i>A. platensis</i> .....	41
3.2.1. Biorreactores y Condiciones de Cultivo .....	41
3.2.2 Medios de Cultivo .....	42
3.2.3. Condiciones de estrés .....	42
3.3. Caracterización del Agua .....	44
3.3.1. Cloruros .....	44
3.3.2. Cloro Residual .....	44
3.3.3. Dureza .....	44
3.3.4. Alcalinidad .....	45
3.3.5. Sulfatos.....	45
3.3.6. Ortofósfonatos .....	45
3.3.7. Nitratos .....	45
3.3.8. Nitritos.....	46
3.4. Caracterización de Compuestos de Interés.....	46
3.4.1. Extracción de Biomasa .....	46
3.4.2. Análisis Bioquímicos .....	46
3.4.3. Métodos de Extracción e Hidrólisis .....	50
3.5. Fermentación de la Biomasa .....	50
3.5.1. Preparación de la Biomasa .....	50
3.5.2. Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	51
3.5.3. Tratamientos y Condiciones de Fermentación.....	51
3.6. Métodos Analíticos .....	52
3.6.1. Cuantificación de Azúcares y Etanol .....	53
3.6.2. Reacción de Conversión de Hexosas a Bioetanol Teórico .....	53
3.6.3. Análisis de Superficie y Optimización Experimental .....	54
3.6.4. Diseño Experimental.....	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	58

4.1. Extracción de Azúcares.....	58
4.1.1. Extracción y cuantificación de azúcares totales.....	58
4.1.2. Extracción y Cuantificación de Azúcares Reductores.....	59
4.2 Efecto de la Calidad del Agua y Deficiencias de Nutrientes .....	60
4.2.1. Caracterización del Agua de Osmosis de Rechazo.....	60
4.2.2. Selección de Cepa para su uso .....	63
4.2.3. Efectos de Deficiencias de Nutrientes .....	64
4.2.4. Deficiencia de Nitrógeno.....	67
4.2.5. Deficiencia de Fósforo .....	67
4.2.6. Deficiencia de Azufre .....	68
4.2.7. Efecto de la Salinidad .....	68
4.2.8. Estrategias Combinadas de Estrés.....	68
4.2.9. Presencia de Azúcares Reductores y Totales en el Medio.....	69
4.3. Estadísticas de Optimización .....	72
4.3.1. Modelo Cuadrático de Predicción .....	72
4.3.2. Estadísticas de Ajuste.....	75
4.3.3. Coeficientes .....	76
4.3.4. Ecuación Cuadrática Generada .....	77
4.3.5. Bioetanol Estimado y Predicho .....	79
4.4. Condiciones Optimizadas.....	82
4.4.1. Producción Teórica de Bioetanol y Métricas Secundarias.....	82
4.4.2. Análisis de la Solución Óptima .....	83
4.4.3. Superficie de Respuesta en la producción de bioetanol .....	83
CONCLUSIONES .....	96
RECOMENDACIONES .....	98
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Objetivos de Desarrollo Sostenible .....	22
2. Factores de optimización.....	52
3. Tratamientos y sus condiciones establecidas por Desing Expert.....	56
4. Efecto de los tratamientos ácidos, sonicación y microondas en la obtención de azúcares totales. ....	59
5. Efecto de los tratamientos ácidos, sonicación y microondas en la obtención de azúcares reductores.....	60
6. Resultados de los análisis de agua de osmosis de rechazo .....	60
7. Efecto en la composición por limitación de nutrientes (mg/g de biomasa). .....	65
8. Presencia de azúcares totales disueltos en el medio. ....	70
9. Presencia de azúcares reductores disueltos en el medio. ....	71
10. Análisis de varianza para modelo cuadrático .....	74
11. Estadísticas de ajuste.....	76
12. Coeficientes estimados del modelo.....	78
13. Rendimiento estimado de Bioetanol en base a los azucares consumidos .....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Absorbancias obtenidas a una longitud de 680nm entre las cepas A. platensis y A. máxima.....	63
2. Numero de células (valor multiplicado por 10000) obtenidas entre las cepas A. platensis y A. máxima. ....	64
3. Biomassas en (g/L) obtenidas entre las cepas A. platensis y A. máxima. ....	64
4. Rampas de optimización con las mejores condiciones para la fermentación, resultado 1 de 100 con una deseabilidad de .93.....	82
5. Gráfico 3D de la mayor interacción entre la Biomasa en g/L y los días de fermentación.....	84
6. Gráfico 3D de la mayor interacción entre la Biomasa en g/L y el % de inoculo en relación al volumen Final.....	86
7. Gráfico 3D de la mayor interacción entre el % de inoculo (p/v) y los días de fermentación.....	89
8. Gráfico de la relación entre los valores predichos y obtenidos.....	92
9. Gráfico de la mayor interacción entre los residuales externamente estudentizados .....	94

## **RESUMEN**

El uso de fuentes de energía renovable se ha vuelto fundamental ante los desafíos globales de sostenibilidad, la crisis energética y los efectos del cambio climático. La producción de biocombustibles, como el bioetanol, surge como una de las soluciones más prometedoras, aunque enfrenta barreras relacionadas con la competencia por tierras agrícolas y el uso de recursos hídricos. En este contexto, el uso de microalgas, específicamente *A. platensis* (espirulina), rica en carbohidratos y con una rápida tasa de crecimiento, se posiciona como una alternativa viable para la producción de bioetanol. Este estudio se desarrolla en tres fases: en la primera, se evalúa la eficiencia de *A. platensis* en la acumulación de biomasa bajo diversas condiciones de cultivo; la segunda fase se centra en la caracterización de los carbohidratos y compuestos bioactivos presentes en dicha biomasa, explorando su potencial para aplicaciones industriales; mientras que en la tercera fase se fermenta esta biomasa para obtener bioetanol. Se postula que esta cianobacteria puede desempeñar un rol clave en la generación de biocombustibles, contribuyendo al desarrollo de tecnologías más sostenibles para la producción de energía limpia y renovable. Este trabajo impacta positivamente en la reducción del uso de combustibles fósiles, además de explorar nuevas aplicaciones industriales de los bioproductos derivados de las microalgas.

## **ABSTRACT**

The use of renewable energy sources has become essential in the face of global sustainability challenges, the energy crisis, and the effects of climate change. The production of biofuels, such as bioethanol, has emerged as one of the most promising solutions, although it faces barriers related to competition for agricultural land and water resources. In this context, the use of microalgae, specifically *A. platensis* (spirulina), which is rich in carbohydrates and has a fast growth rate, stands as a viable alternative for bioethanol production. This study is developed in three phases: the first phase evaluates the efficiency of *A. platensis* in biomass accumulation under different cultivation conditions; the second phase focuses on the characterization of carbohydrates and bioactive compounds present in this biomass, exploring its potential for industrial applications; while the third phase involves fermenting this biomass to produce bioethanol. It is hypothesized that this cyanobacterium can play a key role in biofuel generation, contributing to the development of more sustainable technologies for the production of clean and renewable energy. This work positively impacts the reduction of fossil fuel use while exploring new industrial applications for microalgae-derived bioproducts.

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda de fuentes de energía renovable es esencial para enfrentar los desafíos globales de sostenibilidad, la crisis energética y los efectos del cambio climático. La Agencia Internacional de Energía (IEA) ha destacado la necesidad de diversificar las fuentes energéticas para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y promover la seguridad energética (IEA, 2020). En este contexto, la producción de biocombustibles, como el bioetanol, ha emergido como una solución prometedora, aunque enfrenta desafíos relacionados con la competencia por tierras agrícolas y el uso intensivo de recursos hídricos, lo que puede afectar la seguridad alimentaria y la sostenibilidad ambiental (Jaramillo O., 2011).

La optimización de recursos y la disminución del impacto ambiental son fundamentales para avanzar hacia una sostenibilidad real (Arahou et al., 2021). La economía circular se presenta como un modelo clave en este sentido, ya que busca maximizar el valor de los recursos durante su ciclo de vida, promoviendo su reutilización y minimizando los desechos y la contaminación (Bernardo et al., 2023). Este enfoque es especialmente relevante en la producción de bioetanol a partir de microalgas, pues permite un uso eficiente de los recursos naturales y ofrece beneficios tanto económicos como ambientales. Las microalgas pueden cultivarse en aguas no aptas para la agricultura, lo que evita la competencia con cultivos alimentarios y contribuye a la depuración de aguas residuales (Pittman et al., 2011); además, su alto contenido de carbohidratos las hace idóneas para la producción de bioetanol mediante procesos de fermentación (Horst et al., 2011).

Una de las alternativas más prometedoras en el campo de los biocombustibles es el uso de microalgas, específicamente *A. platensis* (espirulina) (Gonzalez & Laroche, 2021). Esta cianobacteria es rica en carbohidratos y presenta una rápida tasa de crecimiento, posicionándose como una opción viable para la producción de bioetanol (Ma'mun et al., 2024). Su cultivo resulta más sostenible en comparación con

los recursos agrícolas tradicionales, ya que no requiere grandes extensiones de tierra ni el uso de fertilizantes sintéticos (Saranraj & Sivasakthi, 2014).

Las microalgas también desempeñan un papel significativo en la remediación ambiental, en particular en el tratamiento de aguas residuales, dada su capacidad para eliminar nutrientes y contaminantes (Ávila et al., 2022). Un caso de interés es el uso de salmuera, resultante de procesos de ósmosis inversa, la cual se caracteriza por altos niveles de salinidad y minerales que dificultan su reutilización en procesos industriales (Do et al., 2021). La integración de microalgas en sistemas de biorremediación de estas salmueras no solo contribuye a su purificación, sino que también favorece la producción de biomasa valiosa, reforzando así los principios de la economía circular (Ali et al., 2023).

Al aprovechar recursos residuales como la salmuera de ósmosis inversa y el CO<sub>2</sub>, las microalgas generan productos de alto valor añadido, como el bioetanol. Este enfoque promueve la sostenibilidad ambiental y ofrece beneficios económicos al transformar desechos en recursos útiles (Chang & sheppard., 2013). La conversión de microalgas, como *A. platensis*, en biocombustibles no solo busca mitigar la dependencia de los combustibles fósiles, sino también fomentar una economía más sostenible, ya que estas microalgas tienen la capacidad de capturar CO<sub>2</sub> de fuentes industriales y contribuir a la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (Chisti, 2007). Este proceso se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Organización de las Naciones Unidas, en particular con el ODS 7 ("Energía asequible y no contaminante"), el ODS 6 ("Agua limpia y saneamiento") y el ODS 12 ("Producción y consumo responsables") (Naciones Unidas, 2015).

El tratamiento de aguas residuales mediante microalgas no solo reduce la contaminación, sino que también posibilita la reutilización del agua, beneficiando a las industrias al disminuir sus costos operativos y facilitar el cumplimiento de normativas

ambientales más estrictas (Al-Jabri et al., 2021). Asimismo, la relevancia de las microalgas radica no solo en su potencial para la producción de biocombustibles, sino también en su capacidad para recuperar nutrientes de las aguas residuales y mejorar la calidad del agua. Por ejemplo, *A. platensis* puede absorber nutrientes como nitrógeno y fósforo, elementos comunes en las aguas residuales industriales, contribuyendo a la reducción de la eutrofización de cuerpos de agua (Hena et al., 2018; Papadopoulos et al., 2022). Este proceso de biorremediación no solo ayuda a depurar las aguas, sino que también produce biomasa utilizable para obtener productos de alto valor, como biocombustibles, alimentos, fertilizantes y cosméticos (Chia et al., 2018), lo cual posiciona a las microalgas como una solución integral para abordar tanto problemas ambientales como económicos (González et al., 2008).

El uso de microalgas en la producción de bioetanol y en la remediación de aguas residuales se presenta, asimismo, como una oportunidad estratégica para diversas industrias (Ahmad, 2022). Empresas del sector energético pueden beneficiarse de la producción de biocombustibles, mientras que aquellas en los sectores agrícola e industrial pueden aprovechar las propiedades nutritivas de las microalgas para elaborar alimentos, piensos animales o productos farmacéuticos (Niccolai et al., 2019). Además, la integración de sistemas de tratamiento de aguas residuales con cultivos de microalgas ofrece una solución rentable y ecológica para la gestión de efluentes, permitiendo a las industrias reducir su impacto ambiental y cumplir con normativas más rigurosas (Ayil et al., 2021).

Este estudio se desarrolla en tres fases: en la primera se evalúa la eficiencia de *A. platensis* en la acumulación de biomasa bajo diversas condiciones de cultivo; en la segunda se caracteriza el contenido de carbohidratos y compuestos bioactivos presentes en dicha biomasa, explorando su potencial para aplicaciones industriales; y en la tercera se fermenta esta biomasa para obtener bioetanol. La producción de bioetanol a partir de *A. platensis* responde no solo a las necesidades energéticas, sino

también a la exigencia de implementar procesos más sostenibles, donde los recursos naturales se utilicen de manera eficiente y con menor impacto ambiental (Ayil et al., 2021).

## HIPÓTESIS

La optimización de las condiciones de cultivo de *Arthrosphaera platensis* en medios modificados permitirá un incremento significativo en la producción de carbohidratos, los cuales, mediante procesos eficientes de extracción y fermentación, favorecerán una mayor conversión a bioetanol y la obtención de compuestos de alto valor añadido, promoviendo así un proceso integral sustentable y económicamente viable.

## **OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo General**

Desarrollar un proceso integral de cultivo, extracción y aprovechamiento de *A. platensis* para la producción de bioetanol y otros compuestos de alto valor añadido, maximizando la eficiencia en la obtención de productos derivados y promoviendo la sostenibilidad en la aplicación de la biomasa residual.

#### **1.1.1 Objetivos Específicos**

Evaluar métodos de extracción y cuantificación de carbohidratos y componentes de interés.

Determinar las condiciones óptimas de cultivo de *A. platensis* en medios modificados para incrementar la producción de carbohidratos.

Optimizar las condiciones de fermentación para la producción de bioetanol.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. La Crisis Hídrica**

La seguridad hídrica es uno de los desafíos más apremiantes del siglo XXI. El acceso al agua limpia y segura no solo es esencial para la salud humana, sino también para el desarrollo económico, la seguridad alimentaria y la sostenibilidad ambiental (Abou-Shady et al., 2023). Sin embargo, fenómenos como el crecimiento poblacional, la urbanización acelerada, el cambio climático y la mala gestión de los recursos han incrementado el estrés hídrico en diversas regiones del mundo, incluyendo América Latina y particularmente México (Hommes et al., 2020; Quiroga & CastelBlanco, 2024).

En este contexto, el tratamiento de aguas residuales se posiciona como una herramienta clave para garantizar la sostenibilidad del recurso hídrico. Tradicionalmente, las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) han operado bajo un modelo lineal, cuyo objetivo principal es eliminar contaminantes antes de verter el agua tratada en cuerpos naturales (Rout et al., 2021). No obstante, este enfoque está siendo reemplazado progresivamente por un modelo circular, que no solo busca descontaminar el agua, sino recuperar recursos valiosos como nutrientes, energía y materia orgánica, transformando los residuos en insumos para nuevos procesos productivos (Ahmad et al., 2022).

Este cambio de paradigma está alineado con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) impulsados en el 2015 por la Organización de las Naciones Unidas (ONU). Entre los más destacados en materia hídrica se establecen en el cuadro 1.

### Cuadro 1. Objetivos de Desarrollo Sostenible

ODS	Titulo	Aplicación
6	Agua limpia y saneamiento	Promoviendo la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y su saneamiento.
7	Energía asequible y no contaminante	Por la producción de bioenergéticos a partir de los subproductos generados en el tratamiento.
11	Ciudades y comunidades sostenibles	Al fomentar infraestructura para reducir el impacto ambiental negativo en zonas urbanas.
12	Producción y consumo responsables	Mediante la reutilización de agua y la valorización de residuos.
13	Acción por el clima	Al reducir emisiones de gases de efecto invernadero gracias a tecnologías y el aprovechamiento de los residuos o subproductos generados.

Fuente: Naciones Unidas. (2015). *Objetivos y metas de desarrollo sostenible*. Recuperado el 7 de abril de 2025, de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>

La transición hacia modelos circulares en el tratamiento de aguas requiere innovación tecnológica, colaboración público-privada, educación ambiental y un marco normativo que favorezca el aprovechamiento integral de los residuos (Robak & Balcerk, 2018). Esta visión no solo mejora la eficiencia de los sistemas de saneamiento, sino que también genera beneficios económicos y sociales, especialmente en comunidades que enfrentan altos niveles de vulnerabilidad hídrica ante el derecho humano de acceso a

este recurso (Larson, 2021).

### **2.1.1. El Problema del Estrés Hídrico y la Seguridad Hídrica**

El estrés hídrico es una de las principales amenazas a la seguridad hídrica a nivel mundial. Se produce cuando la demanda de agua supera la cantidad disponible durante un periodo determinado o cuando la calidad del recurso limita su uso, ligado al cambio climático, el crecimiento poblacional, la expansión de las actividades industriales y agrícolas, y la deficiente gestión del agua (Morante et al., 2022).

En México, el problema se agrava debido a una distribución geográfica desigual del recurso hídrico. Mientras que en el sur del país se presentan lluvias abundantes, el norte enfrenta sequías prolongadas, en algunos estados se encuentran déficit de agua como Baja California donde tienen un déficit de 1,060 m<sup>3</sup> para sustentar su productividad agrícolas y mantenimiento de la población (Cortés & Azuz., 2021).

### **2.1.2. Crisis Hídrica en Nuevo León**

Entre las principales causas de la crisis hídrica en Nuevo León se encuentran la sobreexplotación de los recursos hídricos, la urbanización descontrolada y la falta de infraestructura en los municipios no metropolitanos (Arreguin et al., 2020). En particular, los municipios del sur del estado enfrentan mayores dificultades debido a la falta de inversión en redes de abastecimiento y al incremento de la demanda poblacional sin un aumento proporcional en la oferta de agua (Guerra et al., 2020).

La creciente demanda de agua por parte de los sectores urbano-industrial ha generado una presión considerable sobre los cuerpos de agua superficial y los acuíferos subterráneos (Morante et al., 2022). Esta situación ha llevado a que diversas zonas agrícolas dependan del uso de aguas residuales tratadas como fuente alternativa de riego. Además, las pérdidas de agua por fugas en la red de distribución y la extracción ilegal representan un desafío significativo para garantizar un suministro eficiente y equitativo (Aguilar et al., 2015).

#### **2.1.2.1. Estrategias gubernamentales y privadas para mitigar la crisis**

Las estrategias para mitigar la crisis incluyen el fortalecimiento de la infraestructura de distribución, la implementación de tecnologías alternativas para el tratamiento de agua y la promoción de programas de financiamiento para mejorar la eficiencia hídrica (Aguilar & Ramirez, 2015). Se recomienda incrementar la macro medición en las fuentes de suministro y almacenamiento, así como la micro medición en los hogares para evitar pérdidas innecesarias (Guerra et al., 2020).

Además, Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey (SADM) se ha propuesto la construcción de nuevas redes de suministro en comunidades rurales y la implementación de campañas educativas para fomentar el uso racional del agua ante la crisis hídrica que ha asolado en Monterrey (SADM, 2017). La integración de biotecnologías en el tratamiento de aguas residuales representa una oportunidad para mejorar la eficiencia de los procesos, reducir el consumo energético y generar productos de valor agregado como biofertilizantes, biogás, compuestos bioactivos y biomasa para biocombustibles (Ali et al., 2022). Entre las opciones más prometedoras se encuentran el uso de microalgas, bacterias especializadas, y hongos filamentosos, que pueden absorber metales pesados, nutrientes y otros contaminantes, además de producir biomasa con aplicaciones comerciales (Alprol et al., 2021).

Un enfoque innovador es el uso de fotobiorreactores y sistemas integrados con microalgas, los cuales permiten no solo purificar el agua, sino también capturar CO<sub>2</sub> y producir compuestos como el betacaroteno, lípidos y polisacáridos (Gentscheva et al., 2023). Esta estrategia, en sinergia con los principios de la economía circular, puede transformar a las plantas de tratamiento en biofábricas sostenibles (Ahmad, 2022).

#### **2.1.3. Agua de Rechazo de Ósmosis Inversa**

El agua de rechazo de ósmosis inversa es un subproducto del proceso de filtración mediante membranas semipermeables, en el cual se retienen sales disueltas, materia orgánica y otros contaminantes presentes en el agua de alimentación (Malaeb

& Ayoub, 2011). Esta corriente concentrada representa un desafío ambiental y operativo, ya que su manejo inadecuado puede afectar los ecosistemas y la disponibilidad hídrica (Bartels et al., 2005).

#### **2.1.3.1. ¿Qué es el rechazo de ósmosis inversa?**

El rechazo de ósmosis inversa es el volumen de agua que no atraviesa la membrana durante el proceso de filtración, debido a la retención de contaminantes y sales disueltas (Mondal & Wickramasinghe, 2008). Generalmente, esta fracción de agua contiene una alta concentración de solutos, lo que impide su descarga directa sin tratamiento previo (Al-Obaidi et al., 2020). Dependiendo de la fuente de agua y el tipo de membranas utilizadas, el rechazo puede representar entre el 15% y el 50% del volumen de agua tratada (Garud, et al., 2011).

#### **2.1.3.2. Composición química y problemática ambiental**

El agua de rechazo de ósmosis inversa contiene concentraciones elevadas de sales, metales pesados, nutrientes como nitratos y fosfatos, y, en algunos casos, compuestos orgánicos persistentes (Arola et al., 2019). Esta composición química depende del tipo de fuente hídrica tratada y de las condiciones del proceso de filtración (Albergamo et al., 2019). El vertido no controlado del rechazo puede provocar problemas ambientales significativos, como la salinización del suelo y la contaminación de cuerpos de agua superficiales y subterráneos (Yang et al., 2019). Además, la presencia de contaminantes emergentes, como residuos farmacéuticos y pesticidas, plantea riesgos adicionales para la salud humana y la biodiversidad acuática (Vinardell et al., 2020).

#### **2.1.3.3. Métodos de tratamiento y reutilización del rechazo de ósmosis**

Diversos enfoques han sido desarrollados para mitigar el impacto ambiental del rechazo de ósmosis inversa, incluyendo tratamientos fisicoquímicos, biológicos y de concentración de salmuera (Kucera, 2023). Entre los métodos fisicoquímicos destacan la evaporación solar, la cristalización y la electrodiálisis inversa, que permiten

recuperar agua y minerales valiosos (Anis et al., 2019). En el caso de los tratamientos biológicos, el uso de biorreactores de membrana y algas para la biorremediación de nutrientes y contaminantes emergentes ha demostrado ser una alternativa sostenible (Malaeb & Ayoub, 2011). Además, estrategias de reutilización, como la incorporación del rechazo en procesos industriales, riego de cultivos tolerantes a la salinidad y generación de biogás, han sido propuestas para maximizar el aprovechamiento del recurso hídrico (Bartels et al., 2005).

#### **2.1.3.4. Aplicaciones en biotecnología y producción de biomasa**

El agua de rechazo de ósmosis inversa presenta un potencial significativo en aplicaciones biotecnológicas, especialmente en el cultivo de microorganismos halotolerantes y microalgas para la producción de biomasa (Mondal & Wickramasinghe, 2008). La utilización de este efluente en biorreactores permite el desarrollo de cepas adaptadas a altas concentraciones salinas, las cuales pueden ser empleadas en la síntesis de compuestos de alto valor agregado, como pigmentos, bioetanol y bioplásticos (Al-Obaidi et al., 2020). Además, la combinación de sistemas de ósmosis inversa con bioprocessos ha demostrado ser una estrategia eficiente para la mitigación de residuos líquidos y la valorización de recursos (Garud et al., 2011). En este contexto, el desarrollo de tecnologías híbridas para la integración de la ósmosis inversa con procesos biológicos podría representar una solución sostenible para el manejo del agua residual y la producción de biomasa en el futuro (Arola et al., 2019).

## **2.2. Bioetanol como Alternativa Energética y Sustentable**

### **2.2.1. Importancia del Bioetanol en la Transición Energética**

El bioetanol desempeña un papel fundamental en la transición energética al ser una alternativa renovable que reduce la dependencia de los combustibles fósiles y disminuye las emisiones de gases de efecto invernadero (Susmozas et al., 2020). Su producción a partir de biomasa lignocelulósica permite una mayor sostenibilidad en comparación con los combustibles tradicionales, promoviendo la diversificación de la

matriz energética (Mignogna et al., 2024). Además, la implementación de tecnologías como la conversión de biomasa impulsada por energía solar refuerza su potencial como una fuente de energía limpia y eficiente (Tabah et al., 2017).

#### **2.2.1.1. Biocombustibles y su papel en la reducción de emisiones**

Los biocombustibles, en particular el bioetanol, han demostrado su efectividad en la reducción de emisiones de CO<sub>2</sub> en el sector transporte. En países como Brasil, su uso ha contribuido significativamente a la mitigación del impacto ambiental de los combustibles fósiles, lo que sugiere su viabilidad en otras regiones en transición energética (Carvalho et al., 2023). La evaluación del balance energético del bioetanol indica que su producción y uso generan menores emisiones en comparación con la gasolina, lo que lo convierte en una opción estratégica dentro de los modelos de movilidad sostenible (Swana et al., 2011). No obstante, es necesario considerar el ciclo de vida del bioetanol y sus implicaciones ambientales para asegurar su sostenibilidad a largo plazo (Malça & Freire, 2006; Fierro et al., 2019).

#### **2.2.1.2. Comparación del bioetanol con combustibles fósiles**

El bioetanol representa una alternativa renovable a los combustibles fósiles debido a su menor impacto ambiental y su capacidad de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (Ahmad et al., 2022). A diferencia de la gasolina y el diésel, su producción y combustión generan una menor huella de carbono, especialmente cuando se obtiene a partir de biomasa lignocelulósica (Reijnders & Huijbregts, 2007). En países como Turquía y la Unión Europea, se ha evaluado su viabilidad comercial, destacando su eficiencia en términos de conversión energética y su potencial para sustituir parcialmente los combustibles fósiles en el sector automotriz (Littlewood et al., 2014; Ozdingis & Kocar, 2018). Además, el uso de especies como el álamo en la producción de bioetanol refuerza su sostenibilidad al aprovechar materias primas de rápido crecimiento y bajo costo (Guo et al., 2015). Sin embargo, su implementación a gran escala requiere superar desafíos en materia de costos de producción y eficiencia en la conversión de biomasa (Niphadkar et al., 2018).

### **2.2.1.3. Retos y oportunidades del bioetanol en México**

Uno de los principales desafíos en la producción de bioetanol en México es la infraestructura y los costos de producción. La adaptación de la industria azucarera para la producción de bioetanol, basada en la experiencia brasileña, requiere inversiones significativas en tecnología y eficiencia operativa (López et al., 2021). Además, el uso de residuos agroindustriales como fuente de materia prima presenta una alternativa sostenible, pero su implementación enfrenta barreras tecnológicas y logísticas (Carrillo et al., 2019).

En términos económicos, la integración de bioetanol de segunda generación en la gasolina mexicana podría mejorar la rentabilidad del sector energético y reducir la huella de carbono, aunque se requiere de incentivos financieros y políticas de apoyo para su competitividad frente a los combustibles fósiles (Bautista et al., 2021). Asimismo, la biomasa celulósica disponible en el país, proveniente de cultivos como el agave y la caña de azúcar, representa una oportunidad para incrementar la producción sin comprometer la seguridad alimentaria, aunque es necesario optimizar los procesos de conversión para mejorar los rendimientos (Hernández et al., 2019).

### **2.2.2. Producción de Bioetanol a partir de Microalgas**

La búsqueda de fuentes de energía renovable ha cobrado relevancia en las últimas décadas debido a la necesidad de mitigar el cambio climático y reducir la dependencia de combustibles fósiles (Ma'mun et al., 2024). En este contexto, las microalgas han emergido como una fuente prometedora para la producción de biocombustibles, especialmente bioetanol (Gonzalez & Laroche, 2021). Estos microorganismos fotosintéticos poseen una alta eficiencia en la conversión de dióxido de carbono en biomasa rica en carbohidratos, lo que las hace ideales para la producción de bioetanol (Jaramillo, 2011).

El proceso de producción de bioetanol a partir de microalgas implica la conversión

de sus reservas de carbohidratos, principalmente polisacáridos como el almidón y la celulosa, en etanol a través de procesos de fermentación (Lee et al., 2019). Además, las microalgas pueden contribuir a la captura de dióxido de carbono, haciéndolas aún más atractivas desde el punto de vista ambiental (Chanda et al., 2019).

#### **2.2.2.1. Ventajas del uso de microalgas en la producción de bioetanol**

Frente a las técnicas convencionales de producción de bioetanol, que se basan en materias primas como maíz o caña de azúcar, el uso de microalgas requiere menos recursos naturales como el agua dulce y el suelo agrícola. Asimismo, generan menos residuos y tienen el potencial de integrarse en sistemas de tratamiento de aguas residuales, lo que permite una doble funcionalidad en términos de remediación ambiental y producción de energía (Kumar et al., 2018).

Estudios recientes han demostrado que especies como *Chlorella vulgaris* y *A. platensis* tienen un alto contenido de carbohidratos y pueden ser eficientemente convertidas en bioetanol mediante procesos optimizados de hidrólisis y fermentación (Muhamad et al., 2021). Además, la implementación de biorrefinerías basadas en microalgas permite la producción simultánea de bioetanol y otros bioproductos, maximizando el aprovechamiento de la biomasa y aumentando la viabilidad económica del proceso (Kumar & Singh, 2019).

#### **2.2.2.2. Comparación con otras fuentes de biomasa**

El bioetanol puede obtenerse a partir de diversas fuentes de biomasa, incluyendo residuos lignocelulósicos, cultivos energéticos y microalgas, cada una con características y desafíos específicos. La biomasa lignocelulósica, derivada de residuos agrícolas y forestales, es una de las fuentes más utilizadas debido a su abundancia y bajo costo; sin embargo, su conversión requiere procesos de pretratamiento intensivos para romper su estructura resistente (Limayem & Ricke, 2012; Chen & Fu, 2016). Por otro lado, las microalgas han surgido como una alternativa prometedora debido a su alto contenido de carbohidratos y su capacidad de crecer en

ambientes no aptos para cultivos convencionales (Harun et al., 2010; Lakatos et al., 2019). Estudios han demostrado que el pretratamiento ácido y enzimático de la biomasa microalgal mejora significativamente la eficiencia de conversión a bioetanol (Harun & Danquah, 2011a; Harun & Danquah, 2011b; Velazquez et al., 2018).

Comparativamente, la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos presenta mayores retos en términos de eficiencia energética y uso de agua, mientras que la microalgal ofrece ventajas en términos de sostenibilidad y menor impacto ambiental (Phwan et al., 2018; Tayyab et al., 2018). Sin embargo, los costos de producción y escalabilidad siguen siendo barreras para la implementación comercial a gran escala de la biomasa microalgal en comparación con fuentes más tradicionales (Manochio et al., 2017; Robak & Balcerk, 2018). Evaluaciones del ciclo de vida han resaltado la necesidad de optimizar tanto los métodos de pretratamiento como los procesos de fermentación para mejorar la viabilidad económica y ambiental de cada opción (Shakelly et al., 2023).

#### **2.2.2.3. Perspectivas en la bioeconomía y sostenibilidad del proceso**

La implementación de tecnologías basadas en microalgas para la producción de bioetanol y el tratamiento de aguas residuales se alinea con los principios de la economía circular (Mirzaei et al., 2024). Este enfoque busca maximizar la eficiencia en el uso de recursos y minimizar la generación de residuos, promoviendo sistemas sostenibles y rentables (Ansari et al., 2019). Proyectos recientes han demostrado la viabilidad de estas tecnologías a escala industrial, destacando su potencial para contribuir a la transición hacia una economía más verde y sostenible (Koyande et al., 2021).

Además de su potencial energético, las microalgas ofrecen ventajas significativas en el tratamiento de aguas residuales. Su capacidad para eliminar nutrientes y contaminantes las posiciona como una herramienta eficaz en la biorremediación (Aguilar et al., 2015). La integración de cultivos de microalgas en plantas de

tratamiento de aguas residuales no solo mejora la calidad del agua tratada, sino que también produce biomasa utilizable para la generación de biocombustibles. (Gonzalez & Laroche, 2021; Ma'mun et al., 2024)

### **2.2.3. Métodos de Producción de Bioetanol**

El bioetanol es un biocombustible producido a partir de biomasa rica en carbohidratos, mediante un proceso de fermentación seguido de una destilación y purificación. Dependiendo de la materia prima utilizada, la producción de bioetanol se clasifica en primera, segunda y tercera generación. La primera generación emplea cultivos agrícolas como el maíz y la caña de azúcar, mientras que la segunda generación utiliza residuos lignocelulósicos, y la tercera generación se basa en microalgas (Sharma et al., 2020; Edeh, 2021). La selección del método de producción depende de la disponibilidad de materia prima, la eficiencia del proceso y los costos asociados.

#### **2.2.3.1. Etapas del proceso de producción de bioetanol**

El proceso de producción de bioetanol consta de varias etapas principales, cada una de ellas con un papel esencial en la conversión de biomasa en combustible (Gonzalez & Laroche, 2021). La primera fase es el pretratamiento de la biomasa, en la cual la materia prima se somete a procesos físicos, químicos o biológicos con el objetivo de romper su estructura lignocelulósica y hacer accesibles los carbohidratos presentes (Broda et al., 2022). Este paso es fundamental, ya que la biomasa lignocelulósica posee una estructura compleja que dificulta la extracción de azúcares fermentables (Toor et al., 2020). Posteriormente, se lleva a cabo la hidrólisis, proceso en el que los polisacáridos son descompuestos en monosacáridos fermentables mediante hidrólisis enzimática o ácida (Esquivel et al., 2021). La elección del método depende de la biomasa utilizada y de la eficiencia buscada en la liberación de azúcares (Rempel et al., 2021).

Una vez obtenidos los azúcares fermentables, se procede a la fermentación, en la cual

microorganismos especializados convierten estos compuestos en bioetanol. Durante este proceso, factores como el tipo de microorganismo, la temperatura y el pH deben ser controlados para garantizar una alta eficiencia de conversión. Tras la fermentación, el bioetanol producido se separa del medio de cultivo mediante destilación, un proceso térmico que permite concentrar el bioetanol y eliminar subproductos indeseados. Finalmente, el biocombustible pasa por una fase de purificación, donde se eliminan las impurezas mediante técnicas como la deshidratación, asegurando un producto con alta concentración de etanol listo para su uso industrial (Bušić et al., 2018).

#### **2.2.3.2. Fermentación de carbohidratos**

La fermentación es la etapa clave en la producción de bioetanol, donde los microorganismos convierten los azúcares en etanol y CO<sub>2</sub> en condiciones anaerobias (Vinardell et al., 2020). Dependiendo de la materia prima utilizada, los carbohidratos fermentables pueden provenir de almidones, azúcares simples o lignocelulosa (Chen & Fu, 2016). En la fermentación de primera generación, la sacarosa de la caña de azúcar y el almidón del maíz se hidrolizan fácilmente en glucosa y fructosa, que son consumidas rápidamente por levaduras como *S. cerevisiae* (Kumar & Singh, 2019). En contraste, la fermentación de biomasa lignocelulósica requiere pretratamientos más complejos para liberar azúcares pentosas y hexosas, que pueden ser metabolizados por cepas modificadas de levaduras o bacterias (Ozdinguis & Kocar, 2018).

#### **2.2.3.3. Microorganismos utilizados en la fermentación**

Diferentes microorganismos son empleados en la fermentación de los azúcares presentes en la biomasa para la producción de bioetanol (Ding et al., 2017). Entre ellos, las levaduras y las bacterias destacan por su eficiencia en la conversión de sustratos en etanol (Esquivel et al., 2021). *S. cerevisiae* es el microorganismo más utilizado debido a su alta tolerancia al etanol y su capacidad para fermentar la glucosa de manera eficiente, lo que la convierte en la opción preferida en procesos industriales (Robak & Balcerk, 2018). Por otro lado, *Zymomonas mobilis* ha ganado interés en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, ya que presenta una mayor eficiencia en la conversión de azúcares como la xilosa y la arabinosa,

compuestos abundantes en residuos agrícolas y forestales (Panahi et al., 2022).

Además de levaduras y bacterias, los hongos filamentosos han sido explorados para la fermentación en estado sólido, un proceso en el que el sustrato fermentable no se encuentra en solución líquida, sino en un medio sólido con bajo contenido de humedad. Estos hongos poseen la capacidad de secretar enzimas hidrolíticas que favorecen la descomposición de materiales lignocelulósicos, facilitando la liberación de azúcares fermentables y ampliando las opciones para el aprovechamiento de diversas fuentes de biomasa (Carrillo et al., 2019).

#### **2.2.3.4. Factores que afectan la eficiencia de producción**

La eficiencia en la producción de bioetanol depende de múltiples factores que influyen en el rendimiento del proceso. Uno de los aspectos clave es la composición de la biomasa, ya que la biomasa lignocelulósica requiere pretratamientos eficientes para maximizar la disponibilidad de azúcares fermentables. El tipo de pretratamiento utilizado puede afectar la accesibilidad de los polisacáridos y la cantidad de inhibidores generados, lo que repercute directamente en la fermentación. Asimismo, las condiciones de fermentación juegan un papel determinante, ya que parámetros como el pH, la temperatura y la concentración de nutrientes deben ser optimizados para favorecer la actividad microbiana y maximizar la producción de etanol (Susmozas et al., 2020).

Otro factor crucial es la tolerancia de los microorganismos al etanol, ya que la acumulación de este compuesto en el medio de cultivo puede inhibir su crecimiento y disminuir la eficiencia del proceso (Phwan et al., 2019). Para superar este desafío, se han propuesto estrategias como la fermentación extractiva, que permite la eliminación continua del bioetanol producido, evitando su acumulación en concentraciones tóxicas (Ibrahim, 2023). Además, el desarrollo y la selección de cepas microbianas con mayor resistencia al etanol han demostrado ser enfoques prometedores para mejorar la

producción de bioetanol a nivel industrial (Harun & Danquah, 2011a; Lakatos et al., 2019).

## **2.3. Microalgas como Materia Prima para Bioetanol**

### **2.3.1. Producción de Bioetanol a partir de *A. platensis***

La microalga *A. platensis* ha sido ampliamente estudiada por su potencial en la producción de bioetanol debido a su alto contenido de carbohidratos y facilidad de cultivo en diversas condiciones ambientales (Gonzalez & Laroche, 2021). Su uso como materia prima para biocombustibles se fundamenta en su composición química, la eficiencia en la acumulación de biomasa y su adaptabilidad a diferentes medios de cultivo (Ding et al., 2017).

#### **2.3.1.1. Morfología y fisiología de *A. platensis***

*A. platensis* es una cianobacteria filamentosa con una estructura helicoidal característica. Presenta células organizadas en tricomas multicelulares que pueden variar en longitud y diámetro dependiendo de las condiciones ambientales y del medio de cultivo (Markou et al., 2023). Su metabolismo es fotosintético, con una alta capacidad de absorción de luz y eficiencia en la fijación de carbono, lo que la hace adecuada para su uso en sistemas de producción sustentables (Wu et al., 2021).

#### **2.3.1.2. Composición química y contenido de carbohidratos**

La biomasa de *A. platensis* contiene proteínas (50-70%), carbohidratos (15-25%) y lípidos (6-13%), con variaciones según las condiciones de cultivo (Ljubic et al., 2018). La fracción de carbohidratos, clave para la producción de bioetanol, está compuesta principalmente por polisacáridos como la glucosa y la ramnosa, los cuales pueden ser fácilmente hidrolizados y fermentados (Gonzalez & Laroche, 2021).

#### **2.3.1.3. Aplicaciones industriales y biotecnológicas**

*A. platensis* es utilizada en diversas industrias debido a su alta concentración de compuestos bioactivos (Gentscheva et al., 2023). En la industria alimentaria, se emplea como suplemento nutricional debido a su elevado contenido de proteínas y

vitaminas (Chang & Liu, 2024). En biotecnología, su biomasa se investiga para aplicaciones en la producción de bioetanol, cosméticos, biofertilizantes y pigmentos naturales (Wu et al., 2021).

### **2.3.2. Optimización del Cultivo de *A. platensis***

#### **2.3.2.1. Factores que afectan el crecimiento y acumulación de carbohidratos**

El crecimiento y la acumulación de carbohidratos en *A. platensis* están influenciados por factores como la disponibilidad de nutrientes, la intensidad luminosa, la temperatura y la salinidad del medio de cultivo (Gonzalez & Laroche, 2021). La reducción de nitrógeno en el medio promueve una mayor acumulación de carbohidratos debido a la desviación del metabolismo hacia la síntesis de compuestos de reserva (Wu et al., 2021).

#### **2.3.2.2. Uso de agua de rechazo de ósmosis en el cultivo de microalgas**

El agua de rechazo de ósmosis inversa contiene altas concentraciones de sales y otros compuestos que pueden ser aprovechados en el cultivo de *A. platensis* (Gonzalez & Laroche, 2021). Investigaciones han demostrado que la microalga puede adaptarse a diferentes niveles de salinidad, lo que permite el uso de este tipo de agua como una alternativa sustentable para la producción de biomasa (Markou et al., 2023).

#### **2.3.2.3. Medios de cultivo y su influencia en la productividad**

Los medios de cultivo para *A. platensis* varían en composición dependiendo del objetivo de producción (Zarrouk, 1966). Se han desarrollado medios con diferentes fuentes de nitrógeno y fósforo para optimizar el crecimiento y la acumulación de carbohidratos (Gonzalez & Laroche, 2021). El medio Zarrouk es uno de los más utilizados debido a su balance de nutrientes que favorece una alta tasa de crecimiento (Ljubic et al., 2018).

#### **2.3.2.4. Estrategias de optimización para incrementar la biomasa**

Diversas estrategias pueden emplearse para mejorar la productividad de *A. platensis*, incluyendo la manipulación de la iluminación, el ajuste de la temperatura y

el uso de bioestimulantes (Braun & Colla, 2023). La implementación de sistemas de fotobiorreactores y la optimización de la aireación también han demostrado ser efectivas en la mejora de la biomasa y del contenido de carbohidratos, aumentando así su potencial para la producción de bioetanol (Gonzalez & Laroche, 2021).

## **2.4. Métodos de Extracción y Cuantificación de Carbohidratos**

Los carbohidratos desempeñan un papel crucial en el metabolismo de las microalgas y su aprovechamiento para la producción de bioetanol ha cobrado relevancia en los últimos años (Harun & Danquah, 2011b; Lakatos et al., 2019). La extracción y cuantificación de estos compuestos requieren técnicas especializadas que permitan su recuperación y análisis con alta eficiencia y selectividad (Ma'mun et al., 2024).

### **2.4.1. Métodos de Extracción de Carbohidratos en Microalgas**

La extracción de carbohidratos a partir de microalgas es un paso fundamental para su posterior utilización en la producción de biocombustibles (Chew et al., 2017). Existen diversos enfoques para la extracción de estos compuestos, incluyendo métodos químicos, enzimáticos, físicos y termoquímicos (Laurens et al., 2017, Hernández et al., 2019).

#### **2.4.1.1. Extracción química y enzimática**

La extracción química de carbohidratos en microalgas implica el uso de solventes ácidos o básicos para la ruptura de la pared celular y la liberación de polisacáridos (Gentscheva et al., 2023). El tratamiento ácido, por ejemplo, con ácido sulfúrico diluido, es un método comúnmente utilizado para la hidrólisis de la biomasa y la liberación de azúcares fermentables (Harun & Danquah, 2011b). Por otro lado, la extracción enzimática emplea enzimas como celulasas y hemicelulasas para degradar la matriz polisacáridica sin generar compuestos inhibidores, favoreciendo un mayor rendimiento en la producción de bioetanol (Velazquez et al., 2018).

#### **2.4.1.2. Métodos físicos y termoquímicos**

Los métodos físicos de extracción incluyen la ruptura mecánica de la pared celular mediante ultrasonido, microondas y homogeneización a alta presión. Estas técnicas permiten una mayor liberación de carbohidratos al medio de extracción sin el uso de reactivos químicos agresivos (Phwan et al., 2018). En el caso de los métodos termoquímicos, el pretratamiento con vapor y la hidrólisis con ácidos diluidos han demostrado ser estrategias efectivas para la descomposición de la biomasa y la obtención de azúcares fermentables (Chen & Fu, 2016).

#### **2.4.1.3. Comparación de eficiencia entre distintos métodos**

La eficiencia de los distintos métodos de extracción varía en función del tipo de microalga, la composición de la pared celular y la facilidad de hidrólisis de los polisacáridos. En general, los métodos enzimáticos presentan una mayor selectividad y menor generación de productos inhibidores, pero requieren tiempos de reacción prolongados. Por otro lado, los métodos físicos combinados con pretratamientos químicos pueden incrementar el rendimiento de carbohidratos, aunque a un costo energético mayor (Robak & Balcerk, 2018).

### **2.4.2. Métodos de Cuantificación de Carbohidratos**

#### **2.4.2.1. Técnicas espectrofotométricas**

Las técnicas espectrofotométricas son ampliamente utilizadas debido a su facilidad de uso y bajo costo. El método del ácido 3,5-dinitrosalícílico (DNS) permite cuantificar azúcares reductores mediante una reacción colorimétrica (Mignogna et al., 2024). Asimismo, el ensayo de fenol-ácido sulfúrico es empleado para la determinación de carbohidratos totales en muestras de biomasa algal (Susmozas et al., 2020).

#### **2.4.2.2. Cromatografía y análisis estructural**

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permiten la separación e identificación de los distintos azúcares presentes en las muestras de microalgas (BeMiller, 2017). Estas técnicas ofrecen una alta especificidad y sensibilidad en la cuantificación de carbohidratos (Carvalho et al., 2023). Además, el análisis estructural

mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) permite caracterizar la composición y estructura de los polisacáridos presentes en la biomasa microalgal (Fierro et al., 2019).

#### **2.4.2.3. Aplicaciones de los métodos en la optimización del proceso**

La selección del método de extracción y cuantificación adecuado es crucial para optimizar la producción de bioetanol a partir de microalgas (Ibrahim, 2023). La combinación de pretratamientos eficientes con técnicas de análisis precisas permite maximizar el rendimiento de carbohidratos fermentables y mejorar la rentabilidad del proceso (Bautista et al., 2021). Investigaciones recientes han demostrado que la aplicación de métodos fisicoquímicos combinados con cuantificación espectrofotométrica y cromatográfica puede incrementar significativamente la eficiencia de conversión de la biomasa en bioetanol (Carrillo et al., 2019).

### **2.5. Optimización de la Fermentación para la Producción de Bioetanol**

La optimización de la fermentación es un aspecto clave en la producción de bioetanol, ya que permite maximizar el rendimiento del producto y reducir costos operativos (Harun et al., 2010). Factores como la elección del microorganismo, la concentración de carbohidratos y los parámetros ambientales juegan un papel fundamental en la eficiencia del proceso (Carrillo et al., 2019; Ibrahim, 2023).

#### **2.5.1. Factores que Afectan la Fermentación**

##### **2.5.1.1. Tipo de microorganismo y su eficiencia fermentativa**

La selección del microorganismo adecuado es crucial para una fermentación eficiente. Las levaduras, como *S. cerevisiae*, son ampliamente utilizadas debido a su alta tolerancia al etanol y capacidad de fermentar diversos azúcares (Robak & Balcerek, 2018). Sin embargo, otros microorganismos como *Zymomonas mobilis* han demostrado ser más eficientes en la conversión de ciertos carbohidratos, ofreciendo ventajas en términos de productividad y tolerancia a inhibidores (Ibrahim, 2023).

### **2.5.1.2. Concentración de carbohidratos y su influencia en el rendimiento**

La concentración de carbohidratos disponibles en el sustrato impacta directamente el rendimiento de bioetanol (Ding et al., 2017). Concentraciones elevadas pueden mejorar la producción, pero también aumentar la viscosidad del medio, dificultando la transferencia de oxígeno y nutrientes (Harun et al., 2010). Además, la composición del sustrato ya sea lignocelulósico, amiláceo o microalgal, influye en la eficiencia de conversión (Lakatos et al., 2019).

### **2.5.1.3. Parámetros ambientales: pH, temperatura y oxigenación**

El control del pH, temperatura y oxigenación es esencial para optimizar la actividad microbiana. Valores de pH entre 4.0 y 5.5 son ideales para *S. cerevisiae*, mientras que otras especies pueden requerir condiciones ligeramente distintas (Harun & Danquah, 2011a). La temperatura óptima varía entre 30 y 37°C, dependiendo del microorganismo empleado (Phwan et al., 2018). En cuanto a la oxigenación, aunque la fermentación de bioetanol es un proceso anaerobio, la presencia de pequeñas cantidades de oxígeno puede mejorar la producción de biomasa y la eficiencia celular (Chen & Fu, 2016).

## **2.5.2. Métodos de Optimización de la Fermentación**

### **2.5.2.1. Diseño de experimentos y optimización estadística**

El diseño de experimentos (DOE) y la optimización estadística permiten identificar las condiciones óptimas para la fermentación mediante el análisis de múltiples variables simultáneamente. Métodos como la superficie de respuesta (RSM) han sido utilizados para mejorar el rendimiento del bioetanol ajustando parámetros como pH, temperatura y concentración de sustratos (Tayyab et al., 2018; Susmozas et al., 2020).

### **2.5.2.2. Uso de biocatalizadores y enzimas en la fermentación**

El empleo de biocatalizadores y enzimas hidrolíticas ha demostrado mejorar la conversión de carbohidratos en etanol (Ibrahim, 2023). En el caso de la biomasa lignocelulósica, la adición de celulasas y hemicelulasas facilita la degradación de

polímeros complejos en azúcares fermentables (Manochio et al., 2017). La cofermentación con múltiples enzimas también puede aumentar la eficiencia de conversión, reduciendo los tiempos de fermentación (Velázquez et al., 2018).

#### **2.5.2.3. Estrategias de mejora en la conversión de azúcares**

Las estrategias para mejorar la conversión de azúcares incluyen el uso de ingeniería genética para modificar microorganismos, la fermentación en dos etapas y el reciclaje de biomasa celular (Sharma et al., 2020). La adaptación de cepas a condiciones específicas del sustrato puede mejorar la tolerancia a inhibidores y aumentar la producción de bioetanol (Carvalho et al., 2023). Además, el uso de tecnologías emergentes, como la fermentación en sistemas continuos y la integración de procesos de separación *in situ*, ha mostrado resultados prometedores para la optimización del rendimiento (Mignogna et al., 2024).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Diseño del Estudio**

#### **3.1.1. Ubicación del Experimento**

Para optimizar los parámetros de crecimiento y producción de biomasa de *A. platensis* en el contexto de la desalinización del agua, se llevó a cabo un estudio en las instalaciones de Navistar. Este estudio se realizó utilizando la infraestructura del Laboratorio de Biotecnología y el Laboratorio de Biorremediación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **3.1.2. Origen del Agua**

El agua utilizada en el estudio fue obtenida de un sistema de ósmosis inversa de rechazo para el cultivo de las microalgas. Además, se incluyó un grupo de control que utilizó agua destilada de laboratorios de Monterrey, con el objetivo de comparar y evaluar los efectos específicos de la desalinización en la producción de biomasa.

#### **3.1.3. Selección de Cepa**

Se hizo una comparación de crecimiento entre cepas de *Arthrospira*, se evaluó el crecimiento de *A. platensis* y *A. máxima* para su consideración y uso en el experimento considerando su tasa de crecimiento en número celular y de rendimiento de biomasa.

#### **3.1.4. obtención de las Cepas**

La cepa de *A. platensis* fue proporcionada por CINVESTAV y su identidad fue confirmada por secuenciación en el laboratorio de Vitagénesis S.A. de C.V.

### **3.2. Cultivo de *A. platensis***

#### **3.2.1. Biorreactores y Condiciones de Cultivo**

Se utilizaron botellas serológicas transparentes con un volumen de trabajo total de 800 mL de Marca Pyrex para la generación del inoculo y pruebas de limitación de

nutrientes. Se transfirieron con un volumen final 40 L con diferentes tratamientos a biorreactores de bolsa, utilizando bolsas de marca Uline y selladas por calor (por triplicado) para su escalamiento. La densidad inicial de microalgas fue de 50, 000 células por mL medidas por cámara neubauer o 0.3 g/L medida mediante densidad óptica (OD650).

Los biorreactores se mantuvieron bajo una iluminación de 150 µmoles de luz blanca y a una temperatura de 25 °C. Las microalgas crecieron durante 9 días antes del proceso de recolección.

### **3.2.2 Medios de Cultivo**

El medio Jourdan se preparó disolviendo sus componentes en agua destilada, para el crecimiento de *A. platensis*. En primer lugar, se pesaron los componentes nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ), fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de calcio dihidratado ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ). Estos compuestos se incorporaron gradualmente al volumen de agua establecido, manteniendo agitación constante para favorecer su disolución completa. Posteriormente, se añadieron el cloruro de hierro ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) y el ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), los cuales fueron previamente solubilizados en una cantidad de 100 mL de agua para evitar la formación de precipitados y almacenados como solución traza. Finalmente, se incorporó EDTA disódico ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) de la misma marca, utilizado como agente quelante para estabilizar la disponibilidad de hierro en la solución. La mezcla se ajustó a un pH óptimo en el rango de 7.8 a 8 para el crecimiento de *A. platensis*, empleando hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) o ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ , según fuera necesario. Posteriormente, el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos. Una vez enfriado, se almacenó en condiciones estériles hasta su uso en los cultivos experimentales. Todos los reactivos fueron adquiridos de la marca Control Técnico y Representaciones (CTR).

### **3.2.3. Condiciones de estrés**

Para evaluar el efecto de diferentes condiciones de limitación nutricional sobre el

crecimiento de *A. platensis*, se empleó como base de cultivo el medio Zarrouk. Este medio ha sido ampliamente utilizado para el cultivo de cianobacterias del género *Espirulina*, ya que proporciona una mezcla balanceada de macronutrientes y micronutrientes esenciales. La formulación estándar incluye nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, fosfato monopotásico como fuente de fósforo, y sulfatos de sodio y magnesio como principales fuentes de azufre, además de otros componentes necesarios para el crecimiento.

El experimento contempló cinco tratamientos distintos de acuerdo con el posible estrés por nutrientes que mencionan los autores Gonzalez & Laroche (2021) que pueden ocurrir en la cepa. El primero (T1) correspondió al control, en el cual se utilizó el medio Jourdan completo, sin modificaciones. El segundo tratamiento (T2) consistió en una carencia múltiple de nutrientes, suprimiéndose del medio original las fuentes de nitrógeno, fósforo y azufre. Los tratamientos T3, T4 y T5 fueron diseñados para evaluar la deficiencia individual de cada uno de estos elementos. En el T3 se eliminó la fuente de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$ ); en el T4, el fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); y en el T5, los compuestos que aportan azufre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

Cada tratamiento se preparó en matraces Erlenmeyer de 1 litro, conteniendo 700 mL de medio de cultivo correspondiente, previamente esterilizado. Se ajustó el pH de todos los medios a un valor inicial de 9.5 antes de la inoculación, en concordancia con las condiciones óptimas para el desarrollo de *A. platensis*. La inoculación se realizó con una biomasa previamente adaptada, ajustando una densidad óptica inicial de 0.3 a 680 nm ( $\text{DO}_{680}$ ) a 50,000 células por mL medidas por cámara neubauer en todos los casos para garantizar condiciones homogéneas de inicio.

Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones estandarizadas y controladas en una cámara de cultivo con temperatura constante de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. La iluminación fue proporcionada por lámparas LED blancas con una intensidad promedio de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La agitación se realizó manualmente dos veces al día para asegurar una distribución homogénea de la

biomasa y de los nutrientes. El tiempo total del experimento fue de 9 días, durante los cuales se tomaron muestras cada 24 horas para evaluar el crecimiento mediante mediciones de densidad óptica ( $DO_{680}$ ), así como para el posterior análisis de parámetros bioquímicos como el contenido de azúcares, proteínas y pigmentos.

### **3.3. Caracterización del Agua**

La caracterización del agua se llevó a cabo siguiendo las metodologías establecidas en el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (American Public Health Association et al., 2022). Para ello, se realizaron mediciones de diversos parámetros fisicoquímicos con el objetivo de evaluar la calidad del agua analizada.

#### **3.3.1. Cloruros**

La determinación de cloruros en el agua se realiza mediante el método argentométrico, utilizando nitrato de plata ( $AgNO_3$ ) como titulante y cromato de potasio ( $K_2CrO_4$ ) como indicador. Este método se basa en la precipitación del ion cloruro ( $Cl^-$ ) como cloruro de plata ( $AgCl$ ), un compuesto insoluble. La formación del precipitado continúa hasta que todos los iones cloruro han reaccionado; en ese momento, el exceso de nitrato de plata reacciona con el indicador, produciendo un cambio de color rojizo debido a la formación de cromato de plata ( $Ag_2CrO_4$ ), señalando el punto final de la titulación.

#### **3.3.2. Cloro Residual**

La cuantificación del cloro residual, tanto libre como combinado, se realiza utilizando el método colorimétrico con DPD (N, N-dietil-p-fenilendiamina). Este reactivo reacciona con el cloro presente en el agua para formar un compuesto rosado cuya intensidad puede ser medida espectrofotométricamente.

#### **3.3.3. Dureza**

La dureza total del agua, asociada principalmente a la presencia de iones de

calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), se determina por titulación con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Esta sustancia forma complejos estables con los cationes de calcio y magnesio. El procedimiento incluye el uso del indicador negro de eriocromo T, que cambia de color de vino a azul en el punto final de la titulación, indicando que todos los iones metálicos han sido complejados.

### **3.3.4. Alcalinidad**

La alcalinidad se evalúa mediante titulación con una solución estándar de ácido fuerte, generalmente ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) o ácido clorhídrico (HCl). Este procedimiento permite determinar la capacidad del agua para neutralizar ácidos, lo que está directamente relacionado con la presencia de bicarbonatos, carbonatos y, en menor medida, hidróxidos. La medición incluye la identificación de puntos finales a distintos valores de pH (4.5 o 8.3), dependiendo del tipo de alcalinidad que se deseé cuantificar.

### **3.3.5. Sulfatos**

La determinación de sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) se realiza frecuentemente por turbidimetría, utilizando cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) para precipitar el sulfato como sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ). La turbidez generada por esta reacción es proporcional a la concentración de sulfatos en la muestra y se midió espectrofotométricamente.

### **3.3.6. Ortofósforatos**

La cuantificación de ortofósforatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) se lleva a cabo mediante un método colorimétrico basado en la reacción del ion fosfato con molibdato de amonio en medio ácido, formando un complejo de color azul (azul de molibdeno). Este complejo es reducido por agentes como el ácido ascórbico, y su intensidad se midió espectrofotométricamente.

### **3.3.7. Nitratos**

Los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) se determinan por espectrofotometría, empleando un proceso en el cual el nitrato es reducido a nitrito mediante una columna de cadmio o mediante

reactivos reductores. Posteriormente, el nitrito reacciona con sulfanilamida y NEDA (ácido naftiletilendiamina) para formar un compuesto azoico rosado, cuya absorbancia se midió espectrofotométricamente.

### **3.3.8. Nitritos**

La medición de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) se realiza de forma directa mediante un método colorimétrico que implica la formación de un colorante azoico tras la reacción con sulfanilamida y ácido N-1-naftiletilendiamina dihidrocloruro (NEDA), en condiciones ácidas. Este compuesto coloreado es proporcional a la concentración de nitritos y se midió espectrofotométricamente.

## **3.4. Caracterización de Compuestos de Interés**

### **3.4.1. Extracción de Biomasa**

La biomasa fue extraída bajo condiciones estandarizadas del laboratorio mediante centrifugación a 6000 rpm/min para separar el material del medio de cultivo. Posteriormente, se determinó el peso seco de la biomasa tras un secado en horno a 35 °C durante 24 horas.

### **3.4.2. Análisis Bioquímicos**

En esta sección se describen los métodos empleados para determinar el contenido de azúcares y prolina, así como la actividad enzimática de *A. platensis*, incluyendo superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT). Estos análisis permiten evaluar la respuesta bioquímica de la microalga ante condiciones específicas de cultivo y estrés, así como su potencial como fuente de compuestos de interés industrial.

#### **3.4.2.1. Determinación del Contenido Total de Azúcares**

El contenido total de azúcares fue determinado por método dubois según la metodología descrita por Acosta (2020) con modificaciones. Se tomaron 2 mL del extracto de la biomasa de *A. platensis*, a los cuales se les añadieron 1 mL de fenol al 5%. Posteriormente, se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla fue

dejada en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, incubada en un baño maría a 30 °C durante 20 minutos. La absorbancia fue medida a 490 nm para hexosas y 480 nm para pentosas. El contenido total de azúcares se calculó utilizando una curva de calibración basada en glucosa y los resultados fueron expresados en µg/g de biomasa seca.

#### **3.4.2.2. Determinación del Contenido de Azúcares reductores**

La cuantificación de azúcares reductores se realizó siguiendo el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Acosta (2020), adaptado para extractos de microalgas. Se mezclaron 1 mL del extracto de microalga con 1 mL de reactivo DNS. La mezcla se calentó en un baño maría a 100 °C durante 5 minutos para permitir la reacción. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de tartrato de sodio y potasio (Rochelle) al 40% para estabilizar el color. La absorbancia se midió a 540 nm. La concentración de azúcares reductores se determinó mediante una curva estándar construida con soluciones de glucosa de concentraciones conocidas, expresándose los resultados en mg/g de biomasa seca.

#### **3.4.2.3. Determinación de Pigmentos**

Los pigmentos fotosintéticos fueron analizados considerando la metodología de Acosta (2020) con modificaciones, incluyendo clorofila a (chl a), clorofila b (chl b) y carotenoides totales, se trajeron de 100 mg de biomasa fresca en 10 mL de acetona fría al 80% (v/v), mediante agitación nocturna. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 12,000 rpm. Las absorbancias se midieron a 663, 646 y 470 nm. Las concentraciones se calcularon con las ecuaciones 1 a 4 de acuerdo con el procedimiento mencionado de Acosta (2020):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/mL}) = 12.21 \times A663 - 2.81 \times A646 \quad (1)$$

Ecuación 2:

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/mL}) = 20.13 \times A646 - 5.03 \times A663 \quad (2)$$

Ecuación 3:

$$\text{Clorofila Total } (\mu\text{g/mL}) = \text{chl a} + \text{chl b} \quad (3)$$

Ecuación 4:

$$\begin{aligned} \text{Carotenoides totales } (\mu\text{g/mL}) &= (1000 \times A_{470} - 3.27 \times [\text{chl a}] - 104 \times [\text{chl b}]) \\ / 229 & \end{aligned} \quad (4)$$

#### **3.4.2.2. Determinación del Contenido de Prolina**

El análisis del contenido de prolina libre se realizó con base en el protocolo de Carillo & Gibon (2011) con modificaciones. Se colocó 1 mL del extracto de biomasa en un tubo de 15 mL, al cual se le agregaron lentamente 2 mL de la mezcla reactiva compuesta por nihidrina al 1% (p/v) en agua destilada al 40% (v/v) y ácido acético al 60% (v/v). La mezcla fue calentada en un baño de agua a 100 °C durante 15 minutos. Posteriormente, la solución fue enfriada a 20 °C por 10 minutos. Se retiró la esfera de vidrio y se adicionaron 5 mL de tolueno. La mezcla fue agitada en vórtex durante 15 segundos y se dejó incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 90 minutos. La fase superior fue recuperada y su absorbancia se midió a 520 nm. El contenido de prolina libre fue cuantificado mediante una curva de calibración basada en L-prolina (Sigma Aldrich) y expresado en  $\mu\text{mol/g}$  de biomasa seca.

#### **3.4.2.3. Ensayos de Actividad Enzimática**

El extracto enzimático fue obtenido siguiendo el protocolo descrito por Elavarthi & Martin (2010). Se tomaron 0.3 g de biomasa de *A. platensis*, los cuales fueron resuspendidos en 1 mL de solución de homogeneización compuesta por KPO<sub>4</sub> 50 mM a pH 7, EDTA 0.1 mM y polivinilpirrolidona (PVP) al 1% (p/v). La mezcla fue sometida a agitación en vórtex durante 30 segundos y centrifugada a 13,200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue utilizado para la determinación de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT).

#### **3.4.2.4. Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD)**

La actividad de la SOD fue medida espectrofotométricamente de acuerdo con la metodología reportada de Magnani et al. (2000) y Marklund & Marklund (1974), utilizando pirogalol como sustrato. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 50 µL de extracto proteico, 1000 µL de tampón Tris-EDTA-Na2 (pH 8.2, 23 mmol/L, 3.3 mmol/L) y 1000 µL de pirogalol (0.2 mmol/L). La absorbancia fue medida a 480 nm. La actividad de SOD fue expresada en U/mg de proteína, donde 1 U de SOD se definió como la cantidad necesaria para inhibir en un 50% la autooxidación del pirogalol.

#### **3.4.2.5. Actividad de Peroxidasa (POD)**

La actividad de POD fue determinada según lo descrito por García et al. (2019), utilizando pirogalol como sustrato. La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 3 mL e incluyó 15 µL de extracto proteico, 2.5 mL de tampón fosfato (pH 6, 100 mmol/L), 320 µL de pirogalol al 5% y 165 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0.147 mmol/L. La reacción se inició con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la absorbancia fue medida a 420 nm cada 30 segundos durante 1 minuto. La actividad de POD fue definida como la cantidad de enzima necesaria para inhibir la autooxidación del pirogalol en un 50%.

#### **3.4.2.6. Actividad de Ascorbato Peroxidasa (APX)**

La actividad de APX fue determinada según lo descrito por García et al. (2019), mediante la disminución de la absorbancia a 290 nm debido a la oxidación del ascorbato. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 15 µL de extracto proteico, 885 µL de tampón fosfato (pH 6, 50 mmol/L), 50 µL de ácido ascórbico 10 mmol/L y 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10 mmol/L. La actividad de APX se expresó como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 mmol de ascorbato por minuto.

#### **3.4.2.7. Actividad de Catalasa (CAT)**

La actividad de la catalasa fue determinada según lo reportado por García et al. (2019), mediante la disminución de la absorbancia a 240 nm debido a la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La mezcla de reacción incluyó 15 µL de extracto proteico, 965 µL de tampón fosfato (pH 6, 50 mmol/L) y 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0.5 mol/L en un volumen final de 1 mL. La actividad específica de todas las enzimas fue expresada en unidades

de proteína mg-1, y la concentración de proteína se determinó según el método establecido por Bradford (1976) utilizando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como estándar.

### **3.4.3. Métodos de Extracción e Hidrólisis**

#### **3.4.3.1. Hidrólisis con Ácidos**

La biomasa de *A. platensis* se obtuvo mediante filtración, luego de un proceso de floculación y asentamiento durante 30 minutos. Posteriormente, se resuspendió en agua desionizada hasta alcanzar una concentración del 0.01%. Para su tratamiento, se emplearon diferentes ácidos inorgánicos, incluyendo ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ácido nítrico ( $HNO_3$ ), ácido clorhídrico (HCl) y una mezcla de ácidos en relación 1:1:1 en concentraciones de 0.5 N, 1 N y 2.5 N (Esquivel et al., 2021; Ma'mun et al., 2024).

#### **3.4.3.2. Extracción Asistida por Microondas (MAE)**

Se aplicó el método de Extracción e Hidrólisis Asistida por Microondas (MAE) basado en Juin et al. (2015), utilizando un equipo MARS X. Se realizaron hidrólisis con ácidos en concentraciones de 0.5 M, 1 M y 2.5 M a temperaturas (T) de 40 y 80 °C, con tiempos de reacción de 15 a 60 minutos.

#### **3.4.3.3. Extracción Asistida por Ultrasonido**

La biomasa en suspensión se sometió a sonicación en baño ultrasónico (US) o con sonda durante 10 segundos a 10 minutos. Para evitar el sobrecalentamiento, se utilizó un baño de hielo y ciclos de pulso de 30 y 60 segundos (Zou et al., 2013; Carreira et al., 2021; Martins et al., 2025).

## **3.5. Fermentación de la Biomasa**

### **3.5.1. Preparación de la Biomasa**

Siguiendo metodologías de Esquivel et al. (2021) y Phwan et al. (2019) la biomasa recolectada fue filtrada y lavada cuidadosamente con agua destilada para

eliminar impurezas y contaminantes superficiales que pudieran interferir en los procesos posteriores. A continuación, se agregó ácido sulfúrico a una concentración de 2.5 N para llevar a cabo una digestión química que favorece la descomposición de componentes celulares complejos y facilita la liberación de metabolitos. Posteriormente, la biomasa acidificada fue sometida a un proceso de ruptura celular mediante sonicación, utilizando un equipo con potencia de 1800 W durante 1 minuto. Esta técnica mecánica genera cavitación y fuerzas de cizallamiento que permiten desintegrar las paredes celulares y mejorar la extracción de compuestos intracelulares. Finalmente, después del tratamiento por sonicación, se ajustó el pH de la mezcla a 4.5 para estabilizar el medio y optimizar las condiciones para los procesos posteriores.

### **3.5.2. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae***

Con base a Phwan et al. (2019), en el experimento se utilizó la cepa *S. cerevisiae* spp. y se preparó un medio de cultivo a base de Agar M.R.S., el cual se formuló disolviendo en 1 litro de agua destilada los siguientes componentes: 10 g de peptona, 10 g de extracto de carne, 5 g de extracto de levadura, 20 g de glucosa, 1 mL de monoleato de sorbitán, 2 g de fosfato dipotásico, 5 g de acetato de sodio, 2 g de citrato de amonio, 0.2 g de sulfato de magnesio, 0.05 g de sulfato de manganeso. Posteriormente, el medio fue esterilizado en matraces mediante autoclave para su posterior uso. Todas las etapas del cultivo se llevaron a cabo en condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar con luz UV para evitar cualquier tipo de contaminación. Tras la preparación del medio, las levaduras fueron incubadas a 32 °C durante 24 horas con el fin de asegurar su desarrollo antes de ser utilizadas como inóculo en el proceso de producción de bioetanol.

### **3.5.3. Tratamientos y Condiciones de Fermentación**

En el presente estudio, la biomasa de *A. platensis* fue sometida procesos mencionados previamente de hidrolización utilizando ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a una concentración de 2.5 N. Para asegurar una efectiva liberación de los componentes solubles, el proceso de hidrolización se llevó a cabo a una temperatura controlada y se aplicó un tratamiento ultrasónico a 1800 W durante 1 minuto, con el fin de mejorar

la penetración del ácido y facilitar la ruptura de las estructuras celulares de la biomasa.

Una vez realizada la hidrolización, se procedió a establecer las condiciones de fermentación, tomando en cuenta los factores de optimización definidos previamente en el Cuadro 2. Estos factores incluyeron un rango de tiempo de fermentación de 2 a 6 días, para evaluar el efecto de la duración sobre la producción de bioetanol. Asimismo, el sustrato utilizado consistió en biomasa de *A. platensis* en concentraciones variables de 5 a 15 g/L, mientras que el porcentaje de inóculo se ajustó entre 5 y 15% en relación con el volumen (P/V) (Phwan et al., 2019).

El proceso de fermentación se llevó a cabo en frascos de 500 mL con un volumen de 400 mL de medio, equipados con válvulas de aireación para permitir la salida de gases durante la fermentación. Durante este proceso, el pH se ajustó en un rango de 4.5, condición que se ha reportado como óptima para el crecimiento de la cepa utilizada y la posterior producción de bioetanol. Todos los frascos se mantuvieron en una incubadora a una temperatura constante de 32 °C (Phwan et al., 2019).

**Cuadro 2. Factores de optimización.**

Factor	Nivel bajo	Nivel intermedio	Nivel Alto
Biomasa (g/L)	5 (-1)	10 ( 0)	15 (+1)
% Inoculo (p/v)	5 (-1)	10 ( 0)	15 (+1)
Tiempo (días)	2 (-1)	4 ( 0)	6 (+1)

La matriz experimental empleada incluyó 15 corridas experimentales con combinaciones específicas de los tres factores, representadas en niveles reales conforme al cuadro 3.

### **3.6. Métodos Analíticos**

### **3.6.1. Cuantificación de Azúcares y Etanol**

Para la determinación de azúcares totales presentes en la biomasa de *A. platensis*, se empleó el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico, el cual permite detectar carbohidratos de cadena corta, media y larga mediante la reacción con grupos hidroxilo, produciendo un complejo coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente. En el caso de los azúcares reductores, se utilizó el método reportado por Miller (1959), basado en el reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS), que detecta azúcares capaces de reducir iones cúpricos en solución alcalina, formando un compuesto colorido cuyo nivel de absorbancia es proporcional a la concentración de estos monosacáridos y disacáridos reductores (como glucosa, maltosa o lactosa). Estos métodos resultan fundamentales para evaluar el potencial de conversión de los carbohidratos a productos fermentables como el bioetanol.

### **3.6.2. Reacción de Conversión de Hexosas a Bioetanol Teórico**

La fermentación alcohólica de hexosas, autores como Pilarski et al. (2021), Lakatos et al. (2019) y Onyeaka (2022) nos establecen como la glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), se describe mediante la ecuación química 5.



Esta ecuación implica que a partir de 1 mol de glucosa (180 g) se generan 2 moles de etanol (92 g en total, dado que cada mol de etanol pesa 46 g) y 2 moles de dióxido de carbono (88 g). Por tanto, el rendimiento teórico de conversión de glucosa a etanol es del 51.1% en peso, suponiendo una eficiencia completa del proceso y ausencia de productos secundarios Pilarski et al. (2021). Este valor constituye un parámetro de referencia clave para estimar el aprovechamiento energético de los carbohidratos extraídos de la biomasa, especialmente en aplicaciones orientadas a la producción de biocombustibles (Pilarski et al., 2021; Ma'mun et al., 2024). Al comparar las concentraciones de azúcares totales y reductores obtenidas experimentalmente con este rendimiento teórico, es posible inferir la eficiencia potencial del proceso de fermentación, así como ajustar condiciones para maximizar la conversión de sustratos

disponibles en productos de valor.

### **3.6.3. Análisis de Superficie y Optimización Experimental**

Se utilizó un análisis de superficie de respuesta (RSM) con el modelo Box-Behnken, empleando el paquete estadístico Minitab, para evaluar la interacción de nutrientes y su efecto en la composición de la biomasa de *A. platensis*. Este enfoque permitió identificar las condiciones óptimas para la producción de carbohidratos, lípidos, proteínas y biomoléculas de interés, mediante la variación controlada de nutrientes en el medio de cultivo. Además, se empleó este análisis para evaluar las condiciones de fermentación, permitiendo optimizar parámetros como la concentración de nutrientes y las condiciones durante el proceso de fermentación.

### **3.6.4. Diseño Experimental**

se llevó a cabo un diseño experimental orientado a evaluar el impacto de la omisión selectiva de nutrientes esenciales nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S) sobre la composición bioquímica de la biomasa de *A. platensis*, particularmente en la liberación de azúcares reductores y totales hacia el medio de cultivo (Gonzalez & Laroche, 2021). Este enfoque se basó en la inducción de condiciones de estrés nutricional como estrategia para estimular la excreción de metabolitos carbonados, que podrían ser aprovechados en procesos de producción de bioproductos o bioenergía.

Para ello, se establecieron diferentes tratamientos de cultivo con limitaciones específicas: (T2) sin nitrógeno, fósforo ni azufre (NPS); (T3) sin nitrógeno (N); y (T4) sin fósforo (P). Estas condiciones fueron comparadas con medios completos para observar la variación en la excreción de azúcares. Una vez alcanzada una fase estacionaria o de estrés evidente en el cultivo, la biomasa fue extraída y se analizaron los niveles de azúcares reductores y totales disueltos en el medio residual mediante métodos colorimétricos.

#### **3.6.4.1. Diseño experimental para la evaluación multifactorial de la producción de bioetanol en *A. platensis***

Para optimizar las condiciones de cultivo y evaluar el efecto combinado de variables clave en la producción de azúcares reductores y otros metabolitos de interés a partir de la biomasa de *A. platensis*, se diseñó un experimento multifactorial mediante el software Design Expert 12. Se seleccionaron tres factores independientes marcados en el cuadro 2 concentración de biomasa (Factor A), Días (Factor B) y % de inoculo (Factor C), cada uno evaluado en tres niveles codificados como bajo (-1), medio (0) y alto (+1). Esta estrategia experimental permite explorar tanto efectos principales como interacciones cuadráticas y bilineales entre los factores, bajo un diseño estadístico del tipo Box-Behnken, lo cual facilita la construcción de modelos de segundo orden.

**Cuadro 3. Tratamientos y sus condiciones establecidas por Desing Expert**

Tratamiento	Biomasa (g/L)	Tiempo (días)	% Inoculo (p/v)
1	15	6	10
2	5	4	15
3	10	2	15
4	10	6	15
5	10	2	5
6	5	4	5
7	15	4	15
8	15	4	5
9	10	6	5
10	5	2	10
11	5	6	10
12	10	4	10
13	10	4	10
14	15	2	10
15	10	4	10

Este diseño permitió modelar el sistema y ajustar una superficie de respuesta para la variable dependiente (por ejemplo, concentración de azúcares disueltos en el medio post-cultivo). Las repeticiones del punto central (corridas 12, 13 y 15) ofrecen una estimación de la variabilidad experimental y permiten verificar la linealidad del modelo.

La aplicación de este enfoque experimental responde a la necesidad de identificar condiciones óptimas para maximizar la liberación de compuestos

carbonados por parte de la microalga bajo estrés nutricional, buscando un equilibrio entre la limitación de nutrientes y la producción de biomoléculas de interés. El uso de herramientas como Design Expert permite la generación de modelos predictivos y análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia de cada factor e interacción, contribuyendo al desarrollo de procesos biotecnológicos más eficientes y escalables.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Extracción de Azúcares**

#### **4.1.1. Extracción y cuantificación de azúcares totales**

Los resultados indican que la combinación de tratamiento ácido con mezcla de ácidos y sonicación a potencia máxima durante 60 segundos (US 60 s, potencia 100 %) fue el método más eficiente para la obtención de azúcares totales, alcanzando un rendimiento de  $441 \pm 26$  mg/g de biomasa, seguido del tratamiento con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bajo la misma condición ( $274 \pm 31$  mg/g). Esto sugiere que la disruptión celular asistida por ultrasonido mejora sustancialmente la liberación de carbohidratos estructurales de *A. platensis*, especialmente cuando se utiliza una combinación de ácidos, lo cual puede deberse a un efecto sinérgico de hidrólisis que rompe eficazmente las paredes celulares ricas en polisacáridos.

Por otro lado, los tratamientos térmicos por microondas, tanto a  $40^{\circ}\text{C}$  como a  $80^{\circ}\text{C}$ , mostraron una menor eficiencia en la extracción de azúcares totales, independientemente del ácido utilizado. Los valores oscilaron entre 12 y 45 mg/g, lo cual sugiere que, si bien el calentamiento puede facilitar la descomposición parcial de los componentes de la biomasa, no tiene la misma capacidad de disruptión física que la sonicación. Cabe destacar que el  $\text{HNO}_3$  no se utilizó bajo condiciones de sonicación, probablemente por razones de seguridad o reactividad, lo cual limita la comparación directa con otros ácidos en ese conjunto experimental.

**Cuadro 4. Efecto de los tratamientos ácidos, sonicación y microondas en la obtención de azúcares totales.**

mg/g de biomasa	Potencia 50 %	Potencia 100 %	T 40 °C		T 80 °C	
	US 30 s	US 60 s	M 15 min	M 120min	M 15 min	M 120 min
HCl	65±7.7 <sup>c</sup>	77±3.2 <sup>c</sup>	25±1.2 <sup>b</sup>	26±2.7 <sup>b</sup>	44±2.1 <sup>a</sup>	44±2.3 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	187±15 <sup>b</sup>	274±31 <sup>b</sup>	32±1.4 <sup>a</sup>	34±4.5 <sup>a</sup>	41±.6 <sup>b</sup>	40±.6 <sup>b</sup>
HNO <sub>3</sub>	*	*	12±.8 <sup>c</sup>	14±1.9 <sup>c</sup>	42±1.2 <sup>ab</sup>	42±1.3 <sup>ab</sup>
Mezcla ácidos	255±23.1 <sup>a</sup>	441±26 <sup>a</sup>	14±1.1 <sup>c</sup>	16±1.4 <sup>c</sup>	45±1.2 <sup>a</sup>	45±1.2 <sup>a</sup>

#### 4.1.2. Extracción y Cuantificación de Azúcares Reductores

En cuanto a la extracción de azúcares reductores, se observa un comportamiento distinto al de los azúcares totales. En este caso, el tratamiento térmico con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HNO<sub>3</sub> a 80°C (M 15 min) generó los valores más altos, 6.9 ± 0.01 y 6.5 ± 0.02 mg/g, respectivamente. Este resultado sugiere que, bajo condiciones térmicas, estos ácidos promueven la hidrólisis de los polisacáridos hasta azúcares simples, posiblemente debido a su alta capacidad oxidante o despolimerizante. A diferencia del caso anterior, aquí los tratamientos por microondas parecen ser más eficaces que la sonicación para la obtención de azúcares reductores.

No obstante, la mezcla de ácidos que resultó ser altamente efectiva para liberar azúcares totales bajo sonicación no mostró un efecto similar para los azúcares reductores. Su rendimiento fue inferior (entre 2.23 y 4.28 mg/g), lo cual puede atribuirse a una hidrólisis incompleta o a la formación de compuestos intermedios que no reaccionan con los métodos de detección de azúcares reductores. Esto evidencia la necesidad de diferenciar entre estrategias orientadas a obtener oligosacáridos/polisacáridos (azúcares totales) y aquellas dirigidas a liberar monosacáridos (azúcares reductores).

**Cuadro 5. Efecto de los tratamientos ácidos, sonicación y microondas en la obtención de azúcares reductores**

mg/g de biomasa	Potencia 50 %	Potencia 100 %	T 40 °C		T 80 °C	
	US 30 s	US 60 s	M 15 min	M 120 min	M 15 min	M 120 min
HCl	2.226±0.22 <sup>b</sup>	2.47±0.01 <sup>b</sup>	1.9±0.01 <sup>b</sup>	1.76±0.22 <sup>b</sup>	2.2±0.03 <sup>b</sup>	2.10±0.03 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.87±0.12 <sup>ab</sup>	3.19±0.01 <sup>ab</sup>	3.51±0.01 <sup>a</sup>	4.18±0.12 <sup>a</sup>	6.9±0.01 <sup>a</sup>	6.64±0.01 <sup>a</sup>
HNO <sub>3</sub>	1.9±0.05 <sup>c</sup>	2.11±0.005 <sup>b</sup>	3.78±0.005 <sup>a</sup>	4.26±0.05 <sup>a</sup>	6.5±0.02 <sup>a</sup>	6.27±0.02 <sup>a</sup>
Mezcla ácidos	3.85±0.1 <sup>a</sup>	4.28±0.07 <sup>a</sup>	2.28±0.07 <sup>ab</sup>	2.23±0.1 <sup>ab</sup>	2.7±0.02 <sup>ab</sup>	2.65±0.02 <sup>ab</sup>

## 4.2 Efecto de la Calidad del Agua y Deficiencias de Nutrientes

### 4.2.1. Caracterización del Agua de Osmosis de Rechazo

Los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico del agua de rechazo de ósmosis inversa (OR) (cuadro 6) evidencian una marcada concentración de diversos compuestos, derivada del proceso mismo de separación por membranas. En primer lugar, los sólidos disueltos totales (SDT) alcanzaron un valor de  $1451 \pm 432$  mg/mL, superando el límite establecido por la NOM-127-SSA1-2021 (Secretaría de Salud, 2021), que es de 1000 mg/mL. Este incremento es característico del flujo de rechazo, ya que en él se acumulan los solutos que no atraviesan la membrana, y representa un obstáculo para su posible reutilización directa (Ansari et al., 2019).

La salinidad, aunque no se encuentra regulada por la normativa mexicana, registró valores de  $1480 \pm 433$  mg/mL y un porcentaje de  $0.12 \pm 0.01$  %, indicando una elevada presencia de sales, coherente con el alto valor de SDT. Este comportamiento también se refleja en la conductividad eléctrica, que fue de  $2366.6 \pm 15$   $\mu$ S, lo cual refuerza la presencia de una alta carga iónica. Aunque este parámetro no tiene un límite en la normativa vigente, su magnitud está muy por encima de los valores recomendados para aguas destinadas a riego o procesos sensibles a la conductividad (Calhoun et al., 2021).

La alcalinidad fue de  $1500 \pm 250$  mg/L como CaCO<sub>3</sub>, un valor significativamente elevado que sugiere una alta capacidad del agua para neutralizar ácidos. Esta característica podría interferir con procesos industriales o biológicos que requieren condiciones específicas de pH y, al mismo tiempo, puede ofrecer una oportunidad para procesos que requieran medios alcalinos, como algunos cultivos de microalgas halotolerantes (Sahle et al., 2019).

En cuanto al pH, el agua de rechazo mostró un valor de  $8.17 \pm 0.076$ , dentro del rango permitido por la NOM 127 SSA1 2021 (6.5–8.5), lo que indica que, a pesar de su alta carga de sales, el agua no presenta una acidez ni alcalinidad extrema. Esto es relevante, ya que facilita su manejo y tratamiento en procesos biotecnológicos o fisicoquímicos (Vinardell et al., 2020).

Uno de los parámetros más críticos fue la dureza total, con un valor de  $1073.3 \pm 50.3$  mg/L CaCO<sub>3</sub>, lo cual más que duplica el límite normativo de 500 mg/L. Este resultado confirma que el agua de rechazo concentra de manera considerable los iones calcio y magnesio, responsables de la formación de incrustaciones en sistemas hidráulicos y térmicos, lo que podría limitar severamente su reutilización sin tratamiento previo (Mondal et al., 2022). Por otro lado, los niveles de nitratos se mantuvieron bajos, con un valor de  $1.3 \pm 0.06$  mg/L, muy por debajo del límite de 10 mg/L establecido por la norma. Esto indica que no hay una contaminación significativa por compuestos nitrogenados, lo cual podría facilitar su potencial uso agrícola o biológico (Kapoore et al., 2021).

En conjunto, estos resultados confirman que el agua de rechazo de ósmosis inversa presenta una composición significativamente distinta a la del agua potable o incluso de uso común, con concentraciones elevadas de sólidos, sales y dureza, aunque con pH y nitratos dentro de rangos aceptables. Estos hallazgos respaldan la necesidad de implementar tratamientos específicos si se busca reutilizar este recurso, así como el potencial de estrategias biotecnológicas como el cultivo de microalgas tolerantes a ambientes salinos para su valorización (Arahou et al., 2021).

**Cuadro 6. Resultados de los análisis de agua de osmosis de rechazo**

Análisis	Unidades	NOM 127 SSA1 2021*	AyD 2023**	Aqua OR
Sólidos disueltos totales	mg/mL	1000	335.7	1451 ± 432
Salinidad	mg/mL	NA	NA	1480 ± 433
Salinidad	%	NA	NA	0.12 ± 0.01
Conductividad	µS	NA	NA	2366.6 ± 15
Alcalinidad	mg/L CaCO <sub>3</sub>	NA	NA	1500 ± 250
pH	-	6.5 – 8.5	7	8.17 ± 0.076
Dureza Total	mg/L CaCO <sub>3</sub>	500	290.1	1073.3 ± 50.3
Nitratos	mg/L	10	0.629	1.3 ± 0.06

Fuente: \*Secretaría de Salud. (2021). Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización (NOM-127-SSA1-2021). Diario Oficial de la Federación.

[https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5656237&fecha=10/01/2022#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5656237&fecha=10/01/2022#gsc.tab=0)

\*\*Laboratorio Central de Calidad de Aguas. Agua y Drenaje de Monterrey. Nuevo León. (s. f.). Calidad del agua suministrada a través de la red durante el primer semestre del 2023.

#### 4.2.2. Selección de Cepa para su uso

Se compararon el uso de las cepas *A. platensis* y *A. máxima* evaluando tanto su número de células, así como, su rendimiento en biomasa. La figura 1 y 2 muestra el impacto de su crecimiento en la absorbancia y número de células sobresaliendo *A. maxima* en esta figura, autores como Milia et al. (2022) y Blanco et al. (2022), se observan comportamientos de mayor absorbancia y crecimiento similares a los obtenidos. Sin embargo, en la Figura 3, se observó una mayor biomasa obtenida en *A. platensis* al igual que los resultados de Milia et al. (2022), haciendo énfasis en el impacto también del crecimiento y características o afinidades que tiene la microalga, por lo que se puede aprovechar más esta misma biomasa para la extracción de sus componentes y rendimiento en g/L obtenidos, así como, mayor aprovechamiento (Blanco et al., 2022; Milia et al., 2022; Mirzaei et al., 2024; Thangsiri et al., 2024).

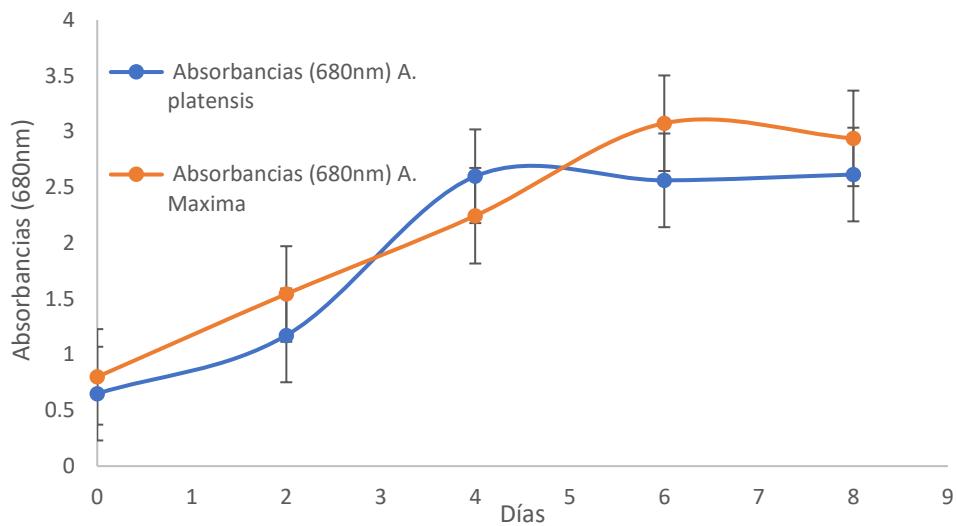


Figura 1. Absorbancias obtenidas a una longitud de 680nm entre las cepas *A. platensis* y *A. máxima*.

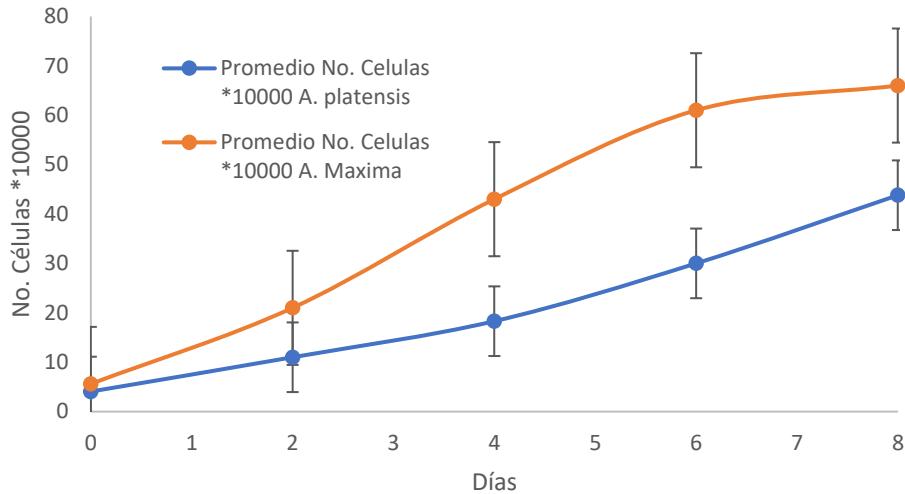


Figura 2. Numero de células (valor multiplicado por 10000) obtenidas entre las cepas *A. platensis* y *A. máxima*.

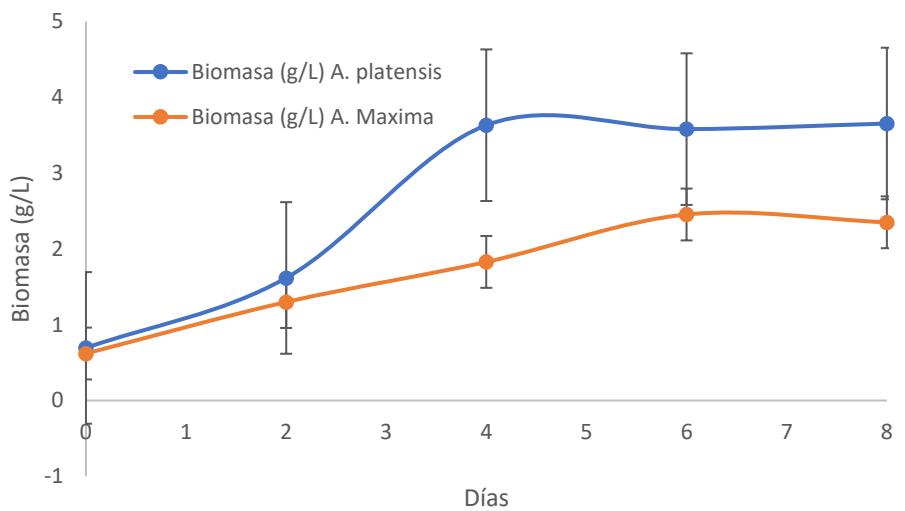


Figura 3. Biomassas en (g/L) obtenidas entre las cepas *A. platensis* y *A. máxima*.

#### 4.2.3. Efectos de Deficiencias de Nutrientes

El cuadro 7 muestra cómo la falta de nutrientes específicos afecta la producción de diferentes compuestos en *A. platensis*, medida en miligramos por gramo de biomasa (mg/g). Se comparan cinco tratamientos: un control (T1, con todos los nutrientes), una condición con carencia múltiple (T2, sin nitrógeno, fósforo ni azufre),

y tres tratamientos con deficiencias individuales de nitrógeno (T3), fósforo (T4) y azufre (T5).

**Cuadro 7. Efecto en la composición por limitación de nutrientes (mg/g de biomasa).**

Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5
Azúcares totales	242±12 <sup>d</sup>	416±19 <sup>a</sup>	310±9 <sup>b</sup>	238±19 <sup>d</sup>	265±6 <sup>c</sup>
Proteína	632±7 <sup>a</sup>	121±1 <sup>d</sup>	233±2 <sup>c</sup>	356±6 <sup>b</sup>	335±3 <sup>b</sup>
Prolina	0.032±0.002 <sup>d</sup>	0.156±0.013 <sup>a</sup>	0.128±0.010 <sup>b</sup>	0.061±0.003 <sup>c</sup>	0.042±0.001 <sup>d</sup>
Clorofila A	3.2±0.1 <sup>a</sup>	0.2±.02 <sup>d</sup>	N/Q	2.4±.02 <sup>b</sup>	1.7±.03 <sup>c</sup>
Clorofila B	2.24±.02 <sup>a</sup>	0.15±.01 <sup>d</sup>	N/Q	1.8±.03 <sup>b</sup>	1.29±0.1 <sup>c</sup>
C. Totales	5.44±0.05 <sup>a</sup>	0.34±0.01 <sup>c</sup>	N/Q	4.08±0.01 <sup>b</sup>	2.89±0.03 <sup>b</sup>
Carotenoides	4±0.1 <sup>c</sup>	49±1.2 <sup>a</sup>	42±2.7 <sup>a</sup>	7±1.1 <sup>b</sup>	6±0.5 <sup>b</sup>

#### **4.2.3.1. Efecto sobre los azúcares totales.**

La limitación de nutrientes influyó notablemente en la acumulación de azúcares. El tratamiento con carencia múltiple (T2) presentó el valor más alto (416 ± 19 mg/g), seguido por la deficiencia de nitrógeno (T3, 310 ± 9 mg/g). Esto sugiere que la falta de nutrientes, especialmente nitrógeno, induce un aumento en la síntesis o acumulación de carbohidratos, posiblemente como reserva energética ante condiciones de estrés. Los tratamientos con deficiencia de fósforo (T4) y azufre (T5) mostraron valores similares al control, indicando que estos nutrientes tienen menor impacto en el metabolismo de azúcares.

#### **4.2.3.2. Impacto en el contenido de proteínas.**

El control (T1) registró la mayor concentración de proteínas (632 ± 7 mg/g), mientras que la carencia múltiple (T2) redujo drásticamente este valor (121 ± 1 mg/g). Las deficiencias individuales de nitrógeno (T3), fósforo (T4) y azufre (T5) también disminuyeron la producción de proteínas, aunque en menor medida.

Esto era esperable, ya que el nitrógeno es un componente esencial de los aminoácidos, y su ausencia limita directamente la síntesis proteica.

#### **4.2.3.3. Prolina como indicador de estrés.**

La prolina, un aminoácido asociado con respuestas al estrés, aumentó significativamente en los tratamientos con limitación nutricional. La carencia múltiple (T2) mostró el valor más alto ( $0.156 \pm 0.013$  mg/g), seguido por la deficiencia de nitrógeno (T3,  $0.128 \pm 0.010$  mg/g). Esto refuerza la idea de que la falta de nutrientes induce estrés metabólico en el organismo, llevando a la acumulación de compuestos protectores como la prolina.

#### **4.2.3.4. Cambios en los pigmentos fotosintéticos.**

Las clorofillas A y B, así como las clorofillas totales, se vieron severamente afectadas por la limitación de nutrientes. El control (T1) presentó los valores más altos, mientras que la carencia múltiple (T2) causó una fuerte disminución. La deficiencia de nitrógeno (T3) hizo que los niveles de clorofila fueran no cuantificables (N/Q), lo que indica que este nutriente es crítico para la fotosíntesis. En contraste, los carotenoides aumentaron en los tratamientos con limitaciones, especialmente en T2 ( $49 \pm 1.2$  mg/g) y T3 ( $42 \pm 2.7$  mg/g). Este incremento podría deberse a un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo generado por la falta de nutrientes.

Los autores Gonzalez & Laroche (2021) destaca que la producción de carbohidratos como el glucógeno en *A. platensis* puede ser significativamente estimulada bajo condiciones de estrés nutricional o ambiental. Estas respuestas adaptativas permiten la reorientación del metabolismo celular hacia la acumulación de compuestos energéticos de reserva, lo cual resulta particularmente atractivo para procesos biotecnológicos como la producción de bioetanol (Yao et al., 2017; Gonzalez & Laroche, 2021).

#### **4.2.4. Deficiencia de Nitrógeno**

La privación de nitrógeno es una de las estrategias más efectivas para inducir la acumulación de carbohidratos, especialmente glucógeno, en *A. platensis*. Bajo esta condición, el carbono fijado fotosintéticamente deja de emplearse en la síntesis de proteínas y se redirige hacia la producción de lípidos y carbohidratos (Rubio et al., 2021). Se ha documentado que el contenido de glucógeno puede alcanzar hasta un 63.2% del peso seco, mientras que el contenido proteico disminuye drásticamente. Además, se observa una reorganización metabólica generalizada, incluyendo reducciones en aminoácidos libres y aumentos en ácidos orgánicos como 2-cetoglutarato y succinato (Chentir et al., 2018). Esta condición no solo altera la composición celular, sino que puede mantener la productividad de biomasa, debido a la menor demanda energética del metabolismo de carbohidratos respecto al de proteínas (Yao et al., 2017).

#### **4.2.5. Deficiencia de Fósforo**

El fósforo regula directamente la síntesis de glucógeno mediante la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa, la cual es inhibida por el fosfato inorgánico (Pi) (Ballicora et al., 2003). Al reducir el Pi, se estimula la producción de ADP-glucosa, precursor del glucógeno. Diversos estudios han demostrado que la reacción enzimática de la ADP-glucosa pirofosforilasa se desglosa en la ecuación 7.



Esta reacción enzimática en cianobacterias está regulada positivamente por el 3-fosfoglicerato (3-PGA) y es inhibida por el Pi (Markou, 2012). Si la concentración de fósforo inorgánico es baja, se estimula la síntesis de glucógeno, como se muestra porque una reducción del fósforo en el medio puede duplicar o incluso triplicar la cantidad de carbohidratos acumulados sin afectar significativamente la biomasa. Por ejemplo, una disminución de la concentración de fosfato de 0.5 a 0.25 g/L incrementó los carbohidratos totales en un 300% (El-Shouny et al., 2024). Esta estrategia es particularmente interesante para maximizar el rendimiento sin comprometer la

productividad celular y al mismo tiempo aumentar el rendimiento de la producción de bioetanol.

#### **4.2.6. Deficiencia de Azufre**

El azufre es esencial para la biosíntesis de aminoácidos y lípidos, por lo que su ausencia afecta directamente la síntesis de proteínas, no obstante, esta deficiencia también induce la acumulación de carbohidratos (cheng & He, 2014). Estudios transcriptómicos han mostrado una disminución en la expresión de genes relacionados con la síntesis proteica y un aumento en aquellos involucrados en el metabolismo de carbohidratos (Kumaresan et al., 2017). Reducciones de hasta un 100% en sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) han resultado en incrementos del 380% en carbohidratos totales, sin impacto significativo en la biomasa (El-Shouny et al., 2024). Aunque se observa una disminución en la productividad de lípidos y proteínas, la reorientación metabólica puede ser aprovechada para fines energéticos como la producción de bioetanol.

#### **4.2.7. Efecto de la Salinidad**

El aumento de la salinidad genera un estrés osmótico que *A. platensis* compensa mediante la producción de solutos compatibles como trehalosa, glucosil-glicerol y glucosil-glicerato (Gonzalez & Laroche, 2021). Estos compuestos no solo estabilizan la célula, sino que también incrementan el contenido total de carbohidratos (Chentir et al., 2018).

Autores como Chentir et al. (2018) que concentraciones crecientes de NaCl (hasta 40 g/L) aumentan tanto los carbohidratos como los lípidos en las células. Además, existe evidencia de que la salinidad puede modificar la expresión génica a través de señales intracelulares como el AMP cíclico, lo cual podría activar rutas metabólicas que favorecen la acumulación de glucógeno (Trewawas et al., 2002; Yoshikawa et al., 2015).

#### **4.2.8. Estrategias Combinadas de Estrés**

Diversos tipos de estrés pueden emplearse para incrementar el contenido de

glucógeno en la biomasa de *Arthrospira*. Aunque la cantidad de investigaciones al respecto aún es limitada, algunos autores han experimentado con la combinación de dos condiciones estresantes con el fin de potenciar aún más la acumulación de glucógeno. Por ejemplo, Aikawa et al. (2012) propusieron el uso simultáneo de una alta intensidad lumínica junto con la depleción de nitrógeno. Esta estrategia les permitió alcanzar un contenido de glucógeno superior al 65% del PS de la biomasa, en comparación con el 18% PS registrado en el grupo control y el 45% PS obtenido al aplicar únicamente la depleción de nitrógeno.

Asimismo, se ha reportado que la combinación de estrés por falta de nitrógeno y estrés osmótico puede influir en la cantidad total de biomasa generada. Sin embargo, esta posible reducción en el rendimiento global se compensa con un aumento considerable en la acumulación de glucógeno al finalizar el cultivo. En este sentido, Ding et al. (2017) documentaron un incremento del 61.5% en el contenido total de carbohidratos en *A. platensis* al aplicar depleción de nitrógeno junto con una elevada concentración de dióxido de carbono (15% de CO<sub>2</sub>). Además, observaron un aumento aún más notable del 228.6% al combinar la depleción de nitrógeno con un estrés osmótico moderado (0.5 M de NaCl), alcanzando un 58% PS en contenido total de carbohidratos en comparación con el cultivo control, el cual no recibió adición de CO<sub>2</sub> ni NaCl.

#### **4.2.9. Presencia de Azúcares Reductores y Totales en el Medio**

Los resultados de los tratamientos T2, T3 y T4 en el medio líquido, después de la extracción de la biomasa de *A. platensis*, reflejan diferencias significativas en la concentración de azúcares reductores y totales disueltos, como se muestra en los Cuadros 8 y 9. Estos valores sugieren que las condiciones de extracción y la limitación de nutrientes afectan la composición de los metabolitos disueltos en el medio.

En contraste, el tratamiento T4, que muestra la menor concentración de estos compuestos ( $18.72 \pm 0.07$  mg/L), podría estar asociado a una menor exposición al estrés celular, una recuperación rápida del microambiente intracelular, o incluso a un

tipo de estrés que favorezca la retención de carbohidratos en la célula. Esta diferencia sugiere que no solo la eficiencia de disruptión física o química es determinante, sino también la capacidad del tratamiento para inducir mecanismos celulares de defensa que involucran la secreción de metabolitos carbonados al medio, fenómeno que puede ser aprovechado industrialmente para facilitar la recolección de azúcares sin necesidad de un proceso intensivo de separación de biomasa.

**Cuadro 8. Presencia de azúcares totales disueltos en el medio.**

Tratamiento	mg/L
T2	608.955±80 <sup>a</sup>
T3	561.556±45 <sup>b</sup>
T4	254.35±62 <sup>c</sup>

En cuanto a los azúcares reductores disueltos (Cuadro 9), el tratamiento T2 (sin nitrógeno, fósforo y azufre) mostró la mayor concentración, alcanzando  $41.01 \pm 0.5$  mg/L, seguido por el tratamiento T3 (sin nitrógeno) con  $31.97 \pm 0.13$  mg/L, y el tratamiento T4 (sin fósforo) con  $18.72 \pm 0.07$  mg/L. Estas concentraciones indican que la eliminación de múltiples nutrientes promueve la liberación de azúcares reductores al medio. Esto concuerda con estudios previos que sugieren que el estrés nutricional incrementa la liberación de metabolitos específicos, como los azúcares reductores, posiblemente debido a mecanismos de respuesta celular al estrés azúcares totales disueltos (Cuadro 8), el tratamiento T2 también presentó la mayor concentración, con  $608.95 \pm 80$  mg/L. El tratamiento T3 mostró una concentración ligeramente inferior ( $561.56 \pm 45$  mg/L), mientras que T4 presentó la menor concentración, con  $254.35 \pm 62$  mg/L. Este patrón sugiere que la combinación de deficiencias nutricionales intensifica la excreción de azúcares totales en comparación con la limitación de un solo nutriente, como se ha reportado en la literatura sobre el metabolismo de estrés en microalgas.

**Cuadro 9. Presencia de azúcares reductores disueltos en el medio.**

Tratamiento	mg/L
T2	41.01±0.5 <sup>a</sup>
T3	31.97±0.13 <sup>ab</sup>
T4/	18.72±0.07 <sup>b</sup>

Los resultados de los tratamientos T2, T3 y T4 en el medio líquido, después de la extracción de la biomasa de *A. platensis*, reflejan diferencias significativas en la concentración de azúcares reductores y totales disueltos, como se muestra en los Cuadros 3 y 4. Estos valores sugieren que las condiciones de extracción y la limitación de nutrientes afectan la composición de los metabolitos disueltos en el medio.

Además, se observó un cambio en el color y la turbidez del medio después de la extracción de la biomasa en estos tratamientos, lo cual puede deberse a la presencia de compuestos extracelulares liberados como respuesta al estrés nutricional. Este fenómeno ha sido documentado en estudios sobre microalgas, donde el cambio en la coloración del medio se asocia con la acumulación de metabolitos secundarios y azúcares.

## 4.3. Estadísticas de Optimización

### 4.3.1. Modelo Cuadrático de Predicción

El análisis de varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático (Cuadro 10) indica que el modelo general es estadísticamente significativo ( $F = 16.11$ ;  $p = 0.0035$ ), lo que sugiere que al menos uno de los términos incluidos tiene un efecto real sobre la respuesta (producción de bioetanol teórico en g/L) y que la variabilidad explicada por el modelo es mucho mayor que la atribuible al error aleatorio. Los términos individuales Biomasa (A), Días (B), Inóculo (C) y el término cuadrático  $C^2$  presentan valores de  $p$  menores a 0.05, lo cual los identifica como efectos significativos en la respuesta. El término cuadrático  $C^2$ , con  $p = 0.049$ , refuerza la presencia de una curvatura importante en el factor de inóculo, lo que sugiere la existencia de un punto óptimo.

La concentración de biomasa algal fue un parámetro que destaca para autores como El-Mekkawi et al. (2019) identifican un rango óptimo entre 90 y 100 g/L para maximizar la producción de bioetanol. Concentraciones por encima de este rango no necesariamente mejoran el rendimiento, debido a posibles efectos de inhibición o limitaciones en la capacidad metabólica del inóculo.

Por otro lado, las interacciones AB, AC y BC, así como los términos cuadráticos  $A^2$  y  $B^2$ , no son estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ), indicando que no contribuyen de manera sustancial al modelo en el contexto actual. Sin embargo, se suelen mantener si son necesarios para respetar la jerarquía del modelo.

El tiempo de fermentación mostró un efecto positivo sobre la producción de bioetanol hasta cierto límite. De acuerdo con el autor El-Mekkawi et al. (2019), un rango de 24 a 50 horas favorece la producción cuando se combina con niveles adecuados de biomasa e inóculo. Sin embargo, tiempos prolongados pueden llevar a una disminución en el rendimiento debido a la acumulación de etanol y su efecto inhibitorio sobre la levadura (Silva et al., 2018).

El-Mekkawi et al. (2019) reportan que el volumen de levadura tiene una influencia

decisiva en la producción de bioetanol, siendo un valor central de 32.5 % v/v óptimo para alcanzar concentraciones de hasta 18.5 g/L. Se observó que volúmenes bajos como los de este experimento requieren tiempos de fermentación mayores para compensar la baja actividad fermentativa, como también lo mencionan El-Dalatony et al. (2016) y Silva et al. (2018).

Un aspecto crítico es el resultado del ajuste del modelo, ya que el valor del Falta de Ajuste es también estadísticamente significativo ( $F = 35.25$ ;  $p = 0.0277$ ), lo cual indica que el modelo no logra capturar adecuadamente todas las tendencias de los datos experimentales. Idealmente, la falta de ajuste no debe ser significativa, ya que un Falta de Ajuste significativo sugiere que el modelo no representa bien la realidad experimental, posiblemente por efectos no modelados o errores sistemáticos.

**Cuadro 10. Análisis de varianza para modelo cuadrático**

---

Respose 1: Bioetanol estimado g/L

Fuente	Suma de cuadrados	df	Media cuadrada	F-value	p-value
modelo	0.4424	9	0.0492	16.11	0.0035
A-Biomasa	0.1821	1	0.1821	59.69	0.0006
B-Días	0.1343	1	0.1343	44.02	0.0012
C-Inoculo	0.0738	1	0.0738	24.19	0.0044
AB	0.0087	1	0.0087	2.84	0.1526
AC	0.0142	1	0.0142	4.67	0.0832
BC	0.0001	1	0.0001	0.0167	0.9021
$A^2$	0.0045	1	0.0045	1.49	0.2771
$B^2$	0.0082	1	0.0082	2.7	0.1612
$C^2$	0.0203	1	0.0203	6.66	0.0494
Residual	0.0153	5	0.0031		
Falta de ajuste	0.015	3	0.005	35.25	0.0277
Error Pure	0.0003	2	0.0001		
Cor Total	0.4577	14			

---

Las interacciones entre estos tres factores son críticas. El-Mekkawi et al. (2019) muestran que la combinación óptima se encuentra en el intervalo de 90–100 g/L de biomasa, 15–20 % v/v de levadura, y 40–50 horas de fermentación. Esta combinación balancea adecuadamente la cantidad de sustrato disponible, la capacidad fermentativa de la levadura y el tiempo necesario para completar la conversión, lo cual fue validado mediante el uso del software Design-Expert.

Aunque el modelo cuadrático ajusta bien la mayoría de los términos principales y explica una proporción significativa de la variabilidad, la presencia de un Falta de Ajuste significativo sugiere que se deben considerar modificaciones al modelo, como agregar puntos de diseño adicionales, replantear algunos términos o explorar transformaciones de la respuesta.

#### **4.3.2. Estadísticas de Ajuste**

Las estadísticas de ajuste del modelo (cuadro 11) muestran un desempeño globalmente aceptable para describir la variable respuesta "etanol teórico g/L". El valor de desviación estándar (Std. Dev.) de 0.0552 indica que el error de predicción promedio es bajo. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es de 0.9667, lo que significa que el 96.67% de la variabilidad observada en los datos puede ser explicada por el modelo. Sin embargo, el  $R^2$  ajustado, que corrige el  $R^2$  según el número de términos del modelo y la cantidad de datos, es de 0.9067, lo cual sigue siendo alto y sugiere un buen ajuste general.

Por otro lado, el  $R^2$  predicho tiene un valor de 0.4753, notablemente menor que el  $R^2$  ajustado, lo que indica que el modelo no predice con la misma eficacia que describe los datos observados. Este descenso puede deberse a sobreajuste (overfitting) o a una variabilidad no capturada por el modelo.

El coeficiente de variación (C.V.) del 8.22% muestra que la dispersión relativa de los datos es baja, lo cual respalda la precisión del modelo. Finalmente, el valor de

precisión Adeq (13.0414) supera ampliamente el umbral mínimo de 4, lo que sugiere que el modelo tiene una señal adecuada en relación con el ruido experimental y puede ser utilizado para navegar el espacio de diseño con confianza.

**Cuadro 11. Estadísticas de ajuste**

Estadística	Valor
Dev. Est.	0.0552
media	0.6719
C.V. %	8.22
R <sup>2</sup>	0.9667
R <sup>2</sup> Ajustada	0.9067
R <sup>2</sup> Predicha	0.4753
Adeq precisión	13.0414

#### **4.3.3. Coeficientes**

Los coeficientes estimados del modelo en términos de factores codificados (Cuadro 12) indican cómo cada variable influye en la respuesta de etanol teórico (g/L), considerando que los demás factores se mantienen constantes. El intercepto del modelo es 0.7553, lo cual representa la media de la respuesta cuando todos los factores están en su nivel codificado cero (nivel medio experimental).

Los coeficientes lineales para los factores principales muestran un efecto positivo y estadísticamente significativo, dado que los intervalos de confianza al 95% no incluyen el valor cero: Biomasa (A) tiene el mayor efecto con un coeficiente de 0.1509, seguido por Días (B) con 0.1296 e Inóculo (C) con 0.0960. Esto sugiere que aumentos en cualquiera de estos factores contribuyen a un incremento en la producción de etanol dentro del rango experimental considerado.

Los efectos de interacción AB y AC son positivos pero sus intervalos de confianza abarcan el cero, lo cual indica que estas interacciones no son estadísticamente significativas al 95%. El efecto BC también es pequeño y no significativo. En cuanto a los términos cuadráticos ( $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$ ), todos presentan coeficientes negativos, lo que sugiere una posible curvatura descendente en la respuesta, es decir, hay un punto óptimo en los niveles de los factores más allá del cual la producción de etanol disminuye. En particular,  $C^2$  (inóculo) tiene un intervalo de confianza cuyo límite superior apenas incluye el cero, indicando una curvatura significativa en ese factor.

Finalmente, los valores de inflación de la varianza (VIF) son cercanos a 1 en todos los casos, lo que confirma que no hay problemas de multicolinealidad entre los factores del modelo y que las estimaciones de los coeficientes son estables y confiables.

#### 4.3.4. Ecuación Cuadrática Generada

La ecuación cuadrática 6 fue obtenida de la Cuadro 12 para estimar la producción teórica de bioetanol (g/L) a partir de la biomasa de *A. platensis*, esta se define como la siguiente.

$$\text{Bioetanol teórico (g/L)} = 0.7554 + 0.1509A + 0.1296B + 0.0960C + 0.0466AB + 0.0597AC + 0.0036BC - 0.0350A^2 - 0.0472B^2 - 0.0742C^2 \quad (6)$$

**Cuadro 12. Coeficientes estimados del modelo**

Factor	Coeficientes estimados	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercepto	0.7554	1	0.0319	0.6734	0.8373	
A-Biomasa	0.1509	1	0.0195	0.1007	0.2011	1
B-Días	0.1296	1	0.0195	0.0794	0.1798	1
C-Inoculo	0.096	1	0.0195	0.0458	0.1462	1
AB	0.0466	1	0.0276	-0.0244	0.1176	1
AC	0.0597	1	0.0276	-0.0113	0.1306	1
BC	0.0036	1	0.0276	-0.0674	0.0746	1
A <sup>2</sup>	-0.035	1	0.0287	-0.1089	0.0388	1.01
B <sup>2</sup>	-0.0472	1	0.0287	-0.1211	0.0266	1.01
C <sup>2</sup>	-0.0742	1	0.0287	-0.148	-0.0003	1.01

#### **4.3.5. Bioetanol Estimado y Predicho**

En el Cuadro 13 se presenta el rendimiento estimado de bioetanol en función de los azúcares totales (AT) consumidos durante el proceso de fermentación. Para cada tratamiento se calcularon tanto el valor estequiométrico teórico de bioetanol como el valor predicho experimentalmente, lo cual permitió analizar la eficiencia del proceso y la validez del modelo de predicción utilizado. La diferencia entre ambos valores refleja el grado de ajuste entre la teoría y la práctica, así como la influencia de factores bioquímicos o ambientales que pudieron alterar el rendimiento esperado.

Se observa que los tratamientos con mayor consumo de azúcares tienden a tener un valor estequiométrico de bioetanol más elevado, lo que es coherente con la relación molar entre los azúcares y el etanol producido en procesos fermentativos. Sin embargo, esta tendencia no siempre se refleja con la misma claridad en los valores de bioetanol predicho, lo cual indica que existen otros factores que afectan la conversión efectiva de azúcares a etanol. Por ejemplo, el tratamiento 13, con un consumo de 1.92 g/L de azúcares, mostró un valor estequiométrico de 0.99 g/L y un valor predicho de 0.7684 g/L, lo que implica una diferencia de 0.21 g/L. Este tipo de diferencias se consideran razonables dentro de un margen de variabilidad experimental.

Por otro lado, se identificaron varios tratamientos con discrepancias importantes entre el valor estequiométrico y el valor predicho, tanto positivas como negativas. En el tratamiento 3, por ejemplo, el valor de bioetanol predicho fue de .65332 g/L, muy por encima del valor estequiométrico de 0.43 g/L.

Asimismo, algunos tratamientos mostraron valores predichos superiores al valor estequiométrico, como es el caso de los tratamientos 1, 4, 7, 11, 12 y 15. Estos resultados, aunque menores en magnitud que el del tratamiento 3, también podrían indicar una sobreestimación del modelo de predicción o la presencia de fuentes adicionales de carbono no contabilizadas inicialmente. Alternativamente, podrían reflejar imprecisiones en la cuantificación de los azúcares consumidos o del bioetanol generado.

En contraste, otros tratamientos como el 2, 8, 9, 10, 13 y 14 presentaron diferencias menores entre el bioetanol predicho y el teórico ( $\pm 0.1$  a  $\pm 0.22$  g/L), lo que sugiere que el modelo de predicción es más confiable bajo ciertas condiciones. Estos tratamientos podrían servir como referencia para optimizar las variables del proceso, ya que presentan una mayor concordancia entre los datos experimentales y los valores teóricos.

**Cuadro 13. Rendimiento estimado de Bioetanol en base a los azúcares consumidos**

Tratamiento	AT consumidos (g/L)	Bioetanol estequiométrico (g/L)	Bioetanol predicho (g/L)	Diferencia entre bioetanol esteq y predicho (g/L)
1	1.261±0.02	0.64±0.01	0.9113	-0.26
2	1.11±0.01	0.57±0.01	0.5925	-0.02
3	0.83±0.04	0.43±0.03	.65332	-0.1
4	0.81±0.02	0.41±0.03	0.7612	-0.34
5	1.28±0.12	0.66±0.09	0.4768	0.17
6	1.49±0.3	0.76±0.05	0.6476	0.22
7	1.57±0.7	0.80±0.05	1.0194	-0.21
8	1.45±0.7	0.74±0.03	0.6056	0.13
9	1.48±0.1	0.76±0.08	0.6488	0.1
10	1.18±0.09	0.60±0.07	0.43037	0.17
11	0.92±0.03	0.47±0.02	0.63637	-0.16
12	1.21±0.11	0.62±0.08	0.7984	-0.17
13	1.92±0.07	0.99±0.03	0.7684	0.21
<b>14</b>	<b>2.010.04</b>	<b>1.03±0.02</b>	<b>0.8927</b>	<b>0.13</b>
15	1.18±0.13	0.61±0.09	0.7984	-0.19

#### 4.4. Condiciones Optimizadas

El modelo de optimización presentado muestra los resultados de un proceso multifactorial diseñado para maximizar la producción de bioetanol a partir de biomasa. Los valores óptimos obtenidos en la Figura 4 para las variables clave fueron 14.0233 g/L de biomasa (A), 13.4067 g/L de inóculo (C) y 5.79693 días de fermentación (B), logrando una deseabilidad perfecta (1.000). Este indicador refleja que la combinación de estas condiciones satisface de manera ideal los criterios de optimización establecidos, equilibrando eficientemente los factores involucrados para alcanzar el objetivo deseado.

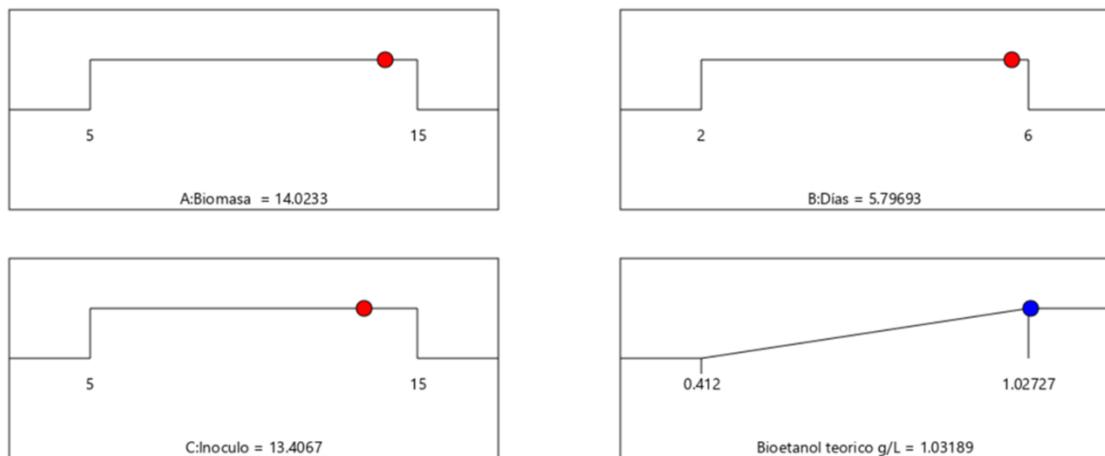


Figura 4. Rampas de optimización con las mejores condiciones para la fermentación, resultado 1 de 100 con una deseabilidad de .93.

##### 4.4.1. Producción Teórica de Bioetanol y Métricas Secundarias.

Bajo las condiciones optimizadas, el modelo predice una producción teórica de bioetanol de 1.03189 g/L. Este valor representa la máxima concentración alcanzable según las variables ajustadas. Además, se observan dos valores numéricos adicionales (0.412 y 1.02727), los cuales podrían corresponder a métricas secundarias relacionadas con la eficiencia del proceso, como ratios de conversión o coeficientes de rendimiento. Sin embargo, su interpretación exacta requiere del contexto específico del diseño experimental y las ecuaciones utilizadas en el modelo.

#### **4.4.2. Análisis de la Solución Óptima**

El resultado "Solución 1 out of 100" indica que, de un total de 100 combinaciones evaluadas, la solución presentada fue identificada como la óptima. Esto sugiere que el algoritmo de optimización, posiblemente basado en métodos de superficie de respuesta o algoritmos genéticos, exploró un amplio espacio de posibilidades antes de converger en esta configuración. La precisión de los valores decimales refleja un ajuste matemático riguroso, aunque es importante destacar que los modelos teóricos pueden no considerar todas las variables prácticas, como inhibiciones metabólicas o condiciones ambientales fluctuantes.

Los resultados demuestran que es posible alcanzar una producción eficiente de bioetanol bajo las condiciones especificadas (El-Mekkawi et al., 2019). No obstante, se recomienda validar experimentalmente estos parámetros para confirmar su aplicabilidad en un entorno real (Barera & Forlani, 2023). Futuros estudios podrían explorar el impacto de otros factores no incluidos en el modelo, como la pureza del sustrato o la presencia de inhibidores, con el fin de optimizar aún más el proceso (Gonzalez & Laroche, 2021). La combinación de modelos teóricos y experimentación práctica resulta esencial para garantizar la escalabilidad y viabilidad del sistema de producción (El-Mekkawi et al., 2019).

#### **4.4.3. Superficie de Respuesta en la producción de bioetanol**

El-Mekkawi et al. (2019) destaca que el mérito de usar la metodología de superficie de respuesta radica en la posibilidad de estudiar más de un parámetro de forma simultánea. Cabe destacar que la selección de los parámetros y sus valores dentro de un rango adecuado depende de su efecto significativamente alto sobre la producción de bioetanol, así como de la influencia que ejercen entre sí. No cabe duda de que una alta biomasa algal requiere un volumen igualmente alto de levadura (% v/v) y un tiempo adecuado para maximizar la producción de bioetanol. No obstante, una elevada concentración de bioetanol puede provocar la degradación de la levadura, lo cual puede ocurrir tanto por procesos prolongados como por concentraciones excesivas de biomasa algal (Markou et al., 2013; Ho et al., 2013; Ashokkumar et al.,

2015).

#### 4.4.3.1. Análisis de la superficie de respuesta 3D para la optimización de bioetanol en función a la biomasa y días

El gráfico de superficie tridimensional (Figura 5) presenta un modelo predictivo que relaciona tres variables fundamentales en el proceso de producción de bioetanol: la concentración de biomasa (A), el tiempo de fermentación (B) y el rendimiento teórico de bioetanol. El eje X representa la concentración de biomasa en gramos por litro, el eje Y muestra el tiempo de fermentación en días, mientras que el eje Z indica la concentración teórica de bioetanol obtenido, expresada en gramos por litro. La gradación de colores en la superficie ilustra claramente las variaciones en el rendimiento según las diferentes combinaciones de los factores estudiados.

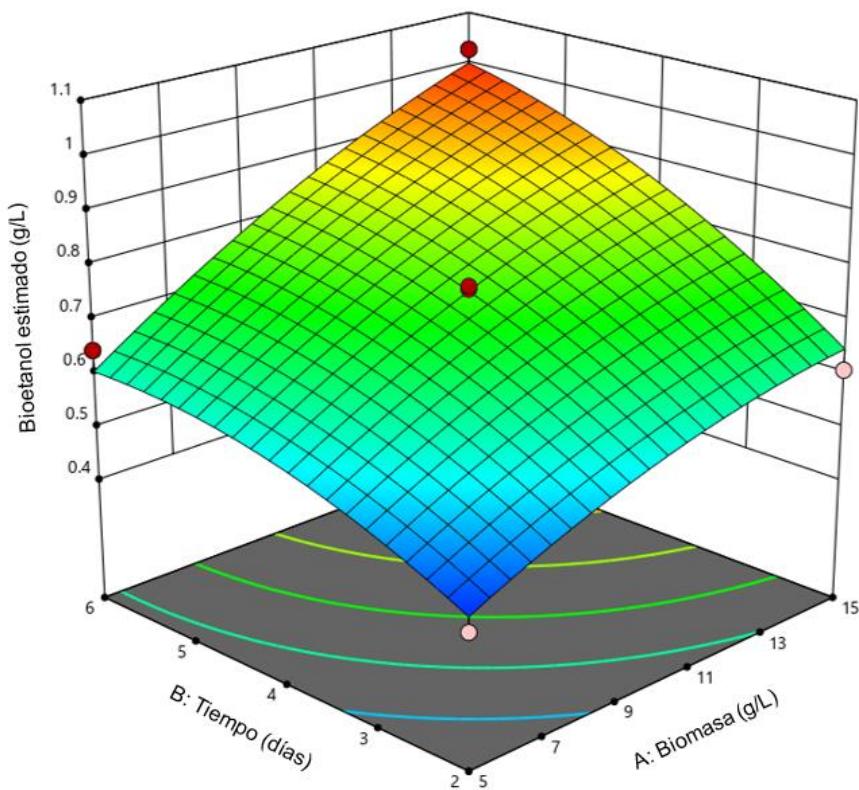


Figura 5. Gráfico 3D de la mayor interacción entre la Biomasa en g/L y los días de fermentación.

#### **4.4.3.2. Relación entre Variables y Eficiencia del Proceso**

El rendimiento de bioetanol mostró una clara dependencia de la interacción entre la concentración de biomasa y el tiempo de fermentación, revelando un comportamiento sinérgico entre ambos factores. Los valores más altos de producción, cercanos a 1.1 g/L, se alcanzaron al combinar concentraciones elevadas de biomasa, en un rango de 9 a 15 g/L, con tiempos de fermentación intermedios, entre 5 y 9 días. Este patrón sugiere la existencia de una región óptima dentro de la superficie de respuesta, en la que las condiciones del sistema favorecen la máxima eficiencia en la conversión de azúcares a etanol.

La interacción entre la concentración de biomasa algal y el volumen de inóculo es fundamental para el rendimiento del proceso. Según El-Mekkawi et al. (2019), cuando se utiliza una biomasa elevada (90–100 g/L), se requiere un volumen adecuado de levadura (alrededor de 15–20 % v/v) para asegurar una fermentación eficiente. Si la biomasa es alta pero el inóculo es bajo, la capacidad de conversión se ve limitada por la insuficiencia de microorganismos activos, lo que reduce la producción de bioetanol. Por otro lado, un exceso de levadura sin suficiente sustrato también puede ser ineficiente, ya que el metabolismo celular no se ve plenamente aprovechado.

No obstante, cuando el tiempo de fermentación se extiende más allá de los 11 días, se observa una disminución en el rendimiento, lo cual podría atribuirse a la acumulación de metabolitos inhibitorios o al agotamiento de los nutrientes disponibles. Estos efectos negativos reflejan los límites fisiológicos del sistema y destacan la importancia de controlar cuidadosamente la duración del proceso.

Los resultados obtenidos a través del análisis de superficie de respuesta aportan información clave para el diseño y optimización de procesos fermentativos. La identificación de la zona óptima, definida por concentraciones de biomasa entre 9 y 15 g/L y tiempos de fermentación entre 5 y 9 días, ofrece una guía útil para establecer parámetros operativos que favorezcan una mayor productividad. Sin embargo, es

importante señalar que estos valores representan predicciones teóricas, por lo que su validación experimental es fundamental.

#### 4.4.4.1. Diagrama de Superficie de Respuesta para la Producción de Bioetanol en función a la biomasa y el inoculo

La Figura 6 muestra un gráfico tridimensional que establece una relación multivariante entre tres parámetros fundamentales en el proceso de producción de bioetanol: la concentración de biomasa (A) expresada en g/L, el porcentaje de inóculo (C) y el rendimiento teórico de bioetanol (en g/L). Este tipo de representación gráfica permite visualizar de manera integral cómo la interacción entre estos factores afecta el rendimiento del proceso de fermentación.

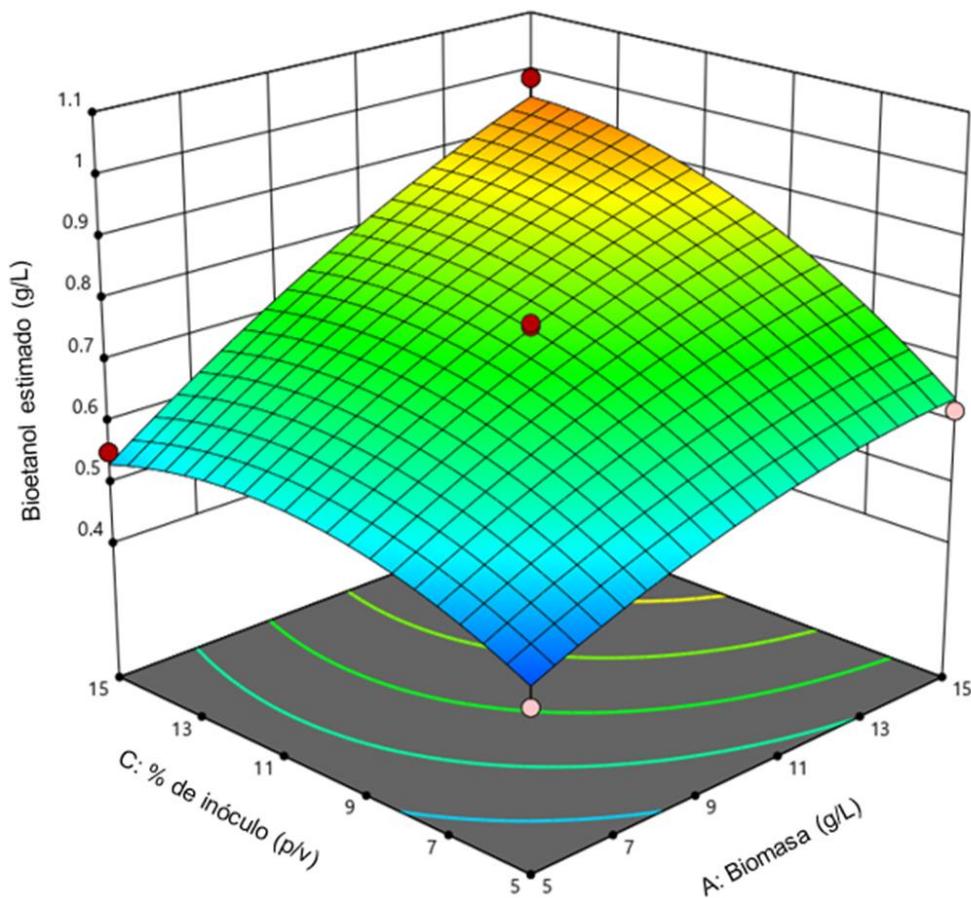


Figura 6. Gráfico 3D de la mayor interacción entre la Biomasa en g/L y el % de inóculo en relación al volumen Final.

#### **4.4.4.2. Análisis de las Variables y su Impacto en el Rendimiento**

Se observa que el rendimiento de bioetanol presenta una marcada dependencia de la concentración de biomasa y del porcentaje de inóculo utilizado. Los valores más elevados de producción (1.0-1.1 g/L) se alcanzan cuando se combinan concentraciones de biomasa entre 9-13 g/L con porcentajes de inóculo del 11-15%. Este comportamiento sugiere la existencia de un rango óptimo donde ambos factores actúan sinéricamente para maximizar la producción. Particularmente notable es el incremento en el rendimiento cuando se supera el umbral de 7 g/L de biomasa y 9% de inóculo, mostrando una clara relación no lineal entre estas variables y la producción.

El tiempo de fermentación interactúa directamente con la concentración de biomasa algal. Como lo indica El-Mekkawi et al. (2019), cuando se trabaja con niveles moderados a altos de biomasa (65–100 g/L), se requiere un tiempo mínimo de 40 horas para alcanzar una conversión adecuada. A medida que se incrementa la biomasa, también aumenta la demanda de tiempo para permitir que la levadura metabolice el sustrato disponible. Sin embargo, si el tiempo se extiende demasiado, pueden acumularse productos secundarios, como etanol en altas concentraciones, que inhiben la actividad de la levadura.

#### **4.4.4.3. Identificación de Zonas Óptimas de Operación**

El análisis de la superficie de respuesta permitió identificar tres regiones diferenciadas en cuanto al rendimiento de bioetanol en función de la concentración de biomasa y el porcentaje de inóculo. Estas regiones ofrecen una visión clara sobre cómo varían los resultados según los niveles de estos factores.

Se identificó una zona de bajo rendimiento, con valores comprendidos entre 0.4 y 0.6 g/L de bioetanol. Esta región se caracteriza por la presencia de bajas concentraciones de biomasa, menores a 7 g/L, y porcentajes reducidos de inóculo, inferiores al 9%. Las condiciones en esta zona no resultan óptimas para el proceso

fermentativo, lo que limita significativamente la producción de etanol.

Posteriormente, se reconoció una zona de transición, con rendimientos que oscilan entre 0.7 y 0.9 g/L. En esta región, se observó que pequeños incrementos tanto en la concentración de biomasa como en el porcentaje de inóculo generan mejoras notables en el rendimiento, lo cual sugiere una mayor sensibilidad del sistema a cambios en estos parámetros. Esta fase es clave para entender la dinámica del proceso y encontrar condiciones más eficientes.

Finalmente, se detectó una meseta de máxima producción, con valores que van de 1.0 a 1.1 g/L de bioetanol. Esta zona se alcanza al combinar concentraciones medias-altas de biomasa e inóculo, indicando que existe una combinación óptima de ambos factores donde el sistema alcanza su máximo rendimiento sin que aumentos adicionales generen mejoras sustanciales.

Los resultados demuestran que el proceso responde positivamente al aumento de ambos parámetros, pero solo hasta ciertos límites. Una vez alcanzada la meseta de máxima producción, incrementos adicionales en la biomasa o el inóculo no generan mejoras significativas en el rendimiento, lo que podría indicar la aparición de fenómenos de inhibición o limitaciones en la transferencia de nutrientes. Es importante destacar que estos valores representan predicciones teóricas que deben ser validadas experimentalmente, considerando además otros parámetros operacionales como pH, temperatura y tiempo de fermentación.

#### **4.4.5. Análisis de la Superficie de Respuesta para la Producción de Bioetanol en Función del Inóculo y Tiempo de Fermentación**

La Figura 7 destaca una relación funcional entre tres variables críticas en el proceso de fermentación: el porcentaje de inóculo (C), el tiempo de fermentación expresado en días (B) y el rendimiento teórico de bioetanol (g/L). Esta representación gráfica permite visualizar de manera integral cómo la interacción entre estos factores

afecta la productividad del proceso biotecnológico.

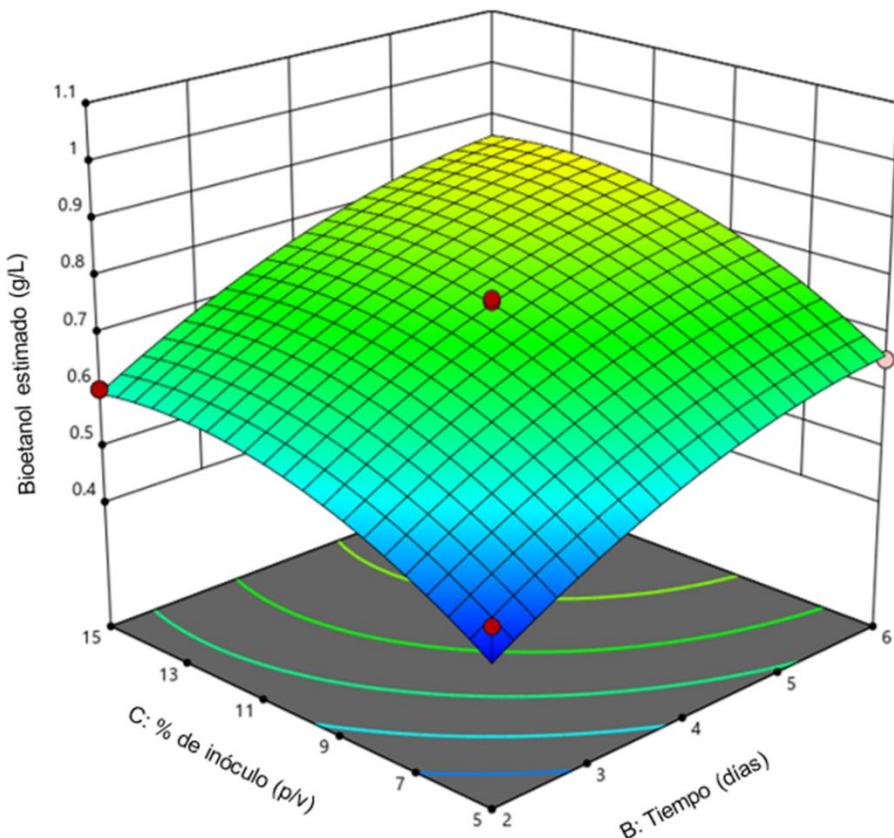


Figura 7. Gráfico 3D de la mayor interacción entre el % de inoculo (p/v) y los días de fermentación.

#### 4.4.5.1. Relación entre Variables y Eficiencia del Proceso

Se observa una clara dependencia del rendimiento de bioetanol respecto a la interacción entre el porcentaje de inoculo y el tiempo de fermentación. Los valores máximos de producción (1.0-1.1 g/L) se alcanzan cuando se combinan porcentajes de inoculo entre 11-15% con tiempos de fermentación de 4-6 días. Este comportamiento evidencia la existencia de un punto óptimo donde ambos parámetros actúan sinéricamente para maximizar la conversión del sustrato. Particularmente notable es el incremento significativo en el rendimiento cuando se supera el umbral de 9% de

inóculo y 3 días de fermentación, mostrando una relación no lineal entre estas variables.

El-Mekkawi et al. (2019) observaron que valores bajos de inóculo (15–20 % v/v) requieren tiempos de fermentación más prolongados (hasta 72 horas) para alcanzar niveles de bioetanol similares a los obtenidos con inóculos más altos. Esto se debe a que una menor densidad celular inicial retrasa la fase exponencial de crecimiento y fermentación. En cambio, cuando se emplea un inóculo más alto, la fermentación puede alcanzar su máximo rendimiento en menor tiempo, lo que optimiza la eficiencia del proceso. Sin embargo, este equilibrio debe ajustarse cuidadosamente para evitar que altas concentraciones de etanol generen un efecto de autoinhibición sobre la levadura (Silva et al., 2018).

#### **4.4.5.2. Identificación de Regiones de Operación Óptima**

El análisis detallado de la superficie de respuesta permitió distinguir tres zonas características que describen el comportamiento del sistema de producción de bioetanol en función del porcentaje de inóculo y el tiempo de fermentación. Estas regiones reflejan cómo la combinación de ambos factores incide directamente en el rendimiento del proceso.

En primer lugar, se identificó una región de bajo rendimiento, con valores entre 0.4 y 0.6 g/L de bioetanol. Esta zona se asocia a porcentajes de inóculo inferiores al 7% y a tiempos de fermentación reducidos, menores a tres días. Bajo estas condiciones, el sistema no cuenta con la suficiente masa microbiana ni con el tiempo necesario para completar una fermentación eficiente, lo que limita considerablemente la producción de etanol.

En segundo lugar, se delimitó una zona de transición, en la que el rendimiento mejora progresivamente, alcanzando valores de entre 0.7 y 0.9 g/L. En esta región, incrementos moderados tanto en el porcentaje de inóculo como en el tiempo de fermentación resultan en mejoras sustanciales en la producción. Este comportamiento indica una mayor eficiencia en el uso de los sustratos y una actividad microbiana más favorable, probablemente debido a un mejor equilibrio entre la cantidad de inóculo y el tiempo disponible para la conversión de azúcares en etanol.

Finalmente, se identificó una meseta de máxima productividad, con rendimientos que oscilan entre 1.0 y 1.1 g/L de bioetanol. Esta zona se alcanza al utilizar porcentajes de inóculo entre 11% y 15%, combinados con tiempos de fermentación de 4 a 6 días. En esta etapa, el sistema parece llegar a su límite de eficiencia, ya que aumentos adicionales en los factores no generan mejoras significativas en la producción. Esto sugiere la existencia de un punto óptimo en el que se maximiza la conversión sin incurrir en excesos que podrían generar pérdidas de recursos o inhibición del proceso.

Los resultados demuestran que el proceso responde positivamente al aumento tanto del inóculo como del tiempo de fermentación, pero solo hasta ciertos límites operacionales. La meseta observada sugiere que tiempos de fermentación superiores a 6 días no generan mejoras significativas en el rendimiento, posiblemente debido a fenómenos de inhibición por acumulación de productos o agotamiento de nutrientes. Es fundamental considerar que estos valores representan predicciones teóricas que requieren validación experimental, incorporando además el análisis de otros parámetros críticos como la concentración de sustrato, pH y temperatura de operación.

#### **4.4.6. Análisis de la Gráfica de Valores Predichos vs. Valores Reales**

El gráfico de dispersión (Figura 8) que compara los valores predichos por el modelo teórico con los valores reales obtenidos experimentalmente muestra una relación directa entre ambas variables, representada mediante puntos distribuidos a lo

largo de la diagonal ideal. La escala en ambos ejes, que varía de 0.4 a 1.1 g/L, corresponde a los valores de concentración de bioetanol obtenidos en el estudio. La proximidad de los puntos a la línea de 45 grados indica un buen ajuste del modelo predictivo, ya que los valores predichos se aproximan significativamente a los valores observados experimentalmente. Este comportamiento sugiere que el modelo matemático desarrollado tiene una capacidad adecuada para estimar la producción de bioetanol bajo las condiciones evaluadas.

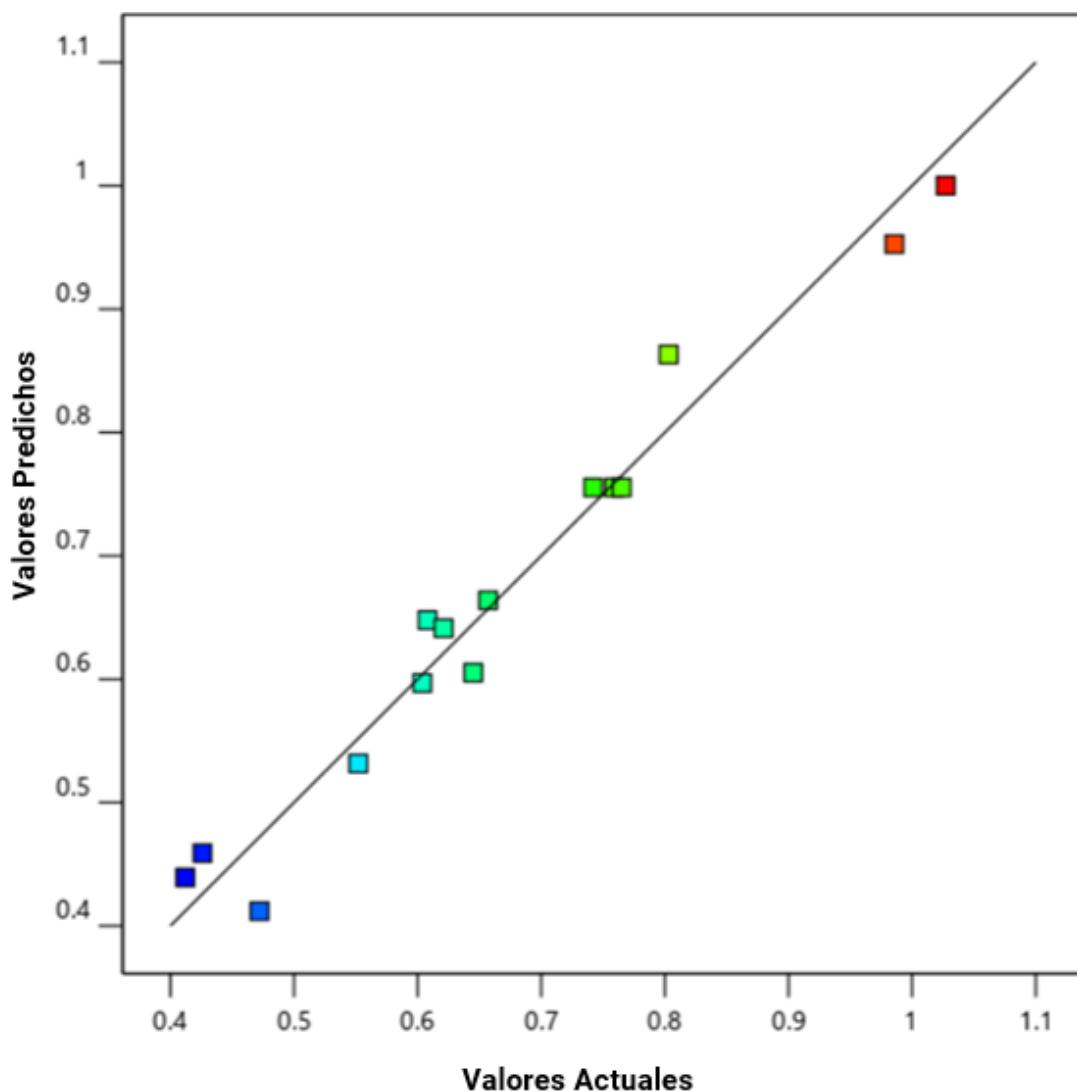


Figura 8. Gráfico de la relación entre los valores predichos y obtenidos

#### 4.4.6.1. Evaluación de la Precisión del Modelo Predictivo

Dentro de los resultados que nos da Desing expert nos establece la distribución de los puntos en el gráfico permite identificar algunos aspectos importantes sobre la confiabilidad del modelo. La mayoría de los valores se agrupan cerca de la línea diagonal, lo que demuestra una correlación positiva entre las predicciones y los resultados reales. Sin embargo, se observan ligeras desviaciones en ciertos puntos, particularmente en los rangos extremos de concentración (tanto en los valores más bajos como en los más altos). Estas discrepancias podrían atribuirse a factores no considerados en el modelo teórico, como variaciones en las condiciones experimentales, la presencia de inhibidores no contemplados o posibles errores en las mediciones. A pesar de estas pequeñas diferencias, el modelo en su conjunto muestra un comportamiento satisfactorio, capaz de predecir con aceptable precisión los rendimientos de bioetanol.

#### **4.4.6.2. Implicaciones y Consideraciones para la Validación del Modelo**

Desing Expert destaca que los resultados obtenidos en este análisis comparativo respaldan la utilidad del modelo predictivo para estimar la producción de bioetanol bajo condiciones controladas. La buena correspondencia entre los valores predichos y reales valida la adecuada selección de parámetros y variables en el desarrollo del modelo teórico. No obstante, las desviaciones observadas en algunos puntos destacan la importancia de considerar posibles fuentes de error y la necesidad de incorporar ajustes que mejoren la precisión en futuras iteraciones del modelo.

#### **4.4.7. Interpretación del Gráfico Normal de Residuales**

El gráfico presentado como Figura 9 corresponde a un análisis de normalidad de los residuales estandarizados externamente, el programa de Desing Expert menciona herramienta fundamental para validar los supuestos del modelo de regresión empleado en el estudio. La distribución de los puntos muestra los residuales ordenados frente a los valores esperados bajo una distribución normal teórica, lo que permite evaluar el cumplimiento del supuesto de normalidad en los errores del modelo.

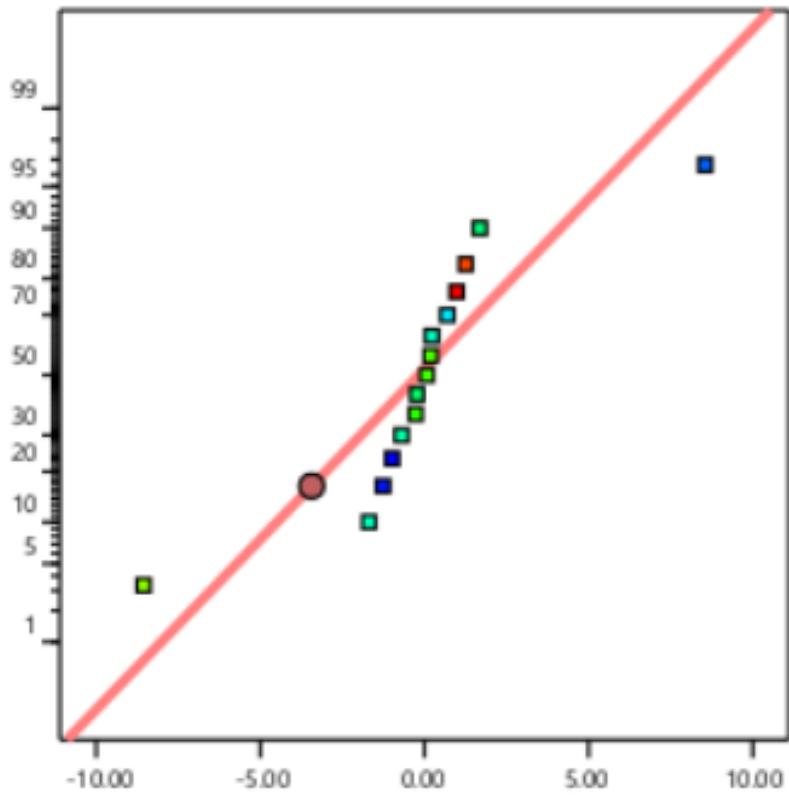


Figura 9. Gráfico de la mayor interacción entre los residuales externamente estudentizados

#### 4.4.7.1. Análisis de la Distribución de Residuales

Se observa que la mayoría de los puntos se distribuyen cercanos a la línea central (valor 0.00), con valores que oscilan principalmente entre -5.00 y 5.00 en la escala de residuales estudentizados. Esta concentración alrededor del cero indica que el modelo tiene un buen ajuste general, ya que los errores son pequeños y aleatorios en su mayoría. Sin embargo, la presencia de algunos puntos que alcanzan valores entre -10.00 y 10.00 sugiere la existencia de posibles valores atípicos u observaciones influyentes en los datos. Estos puntos extremos podrían corresponder a mediciones experimentales con desviaciones significativas del comportamiento predicho por el modelo.

#### 4.4.7.2 Evaluación del Supuesto de Normalidad

La disposición de los residuales en relación con la línea de normalidad teórica

permite evaluar el cumplimiento de este supuesto clave. En este caso, si bien la mayoría de los puntos siguen aproximadamente una tendencia lineal, la presencia de desviaciones en los extremos (especialmente en los valores más altos y bajos) podría indicar una ligera desviación de la normalidad perfecta. Esta situación es común en datos experimentales y no necesariamente invalida el modelo, pero sugiere la conveniencia de realizar pruebas estadísticas complementarias (como Shapiro-Wilk o Kolmogórov-Smirnov) para cuantificar el grado de desviación de la normalidad de acuerdo con literatura del Instituto nacional de estándares y tecnología (National Institute of Standards and Technology, s.f. a; National Institute of Standards and Technology, s.f. b).

## CONCLUSIONES

Este estudio confirma que las condiciones nutricionales y los métodos de extracción aplicados, tienen una influencia determinante sobre la producción de biomasa y la liberación de compuestos valiosos en *A. platensis*. La disponibilidad de nutrientes clave como nitrógeno, fósforo y azufre resultó esencial para el crecimiento celular, mientras que su supresión simultánea generó un mayor nivel de estrés fisiológico, reduciendo la acumulación de biomasa, pero favoreciendo la liberación de compuestos solubles, en particular azúcares.

Los tratamientos de extracción mostraron diferencias relevantes en cuanto a eficiencia: la sonicación de alta potencia fue más eficaz para recuperar azúcares totales, mientras que los microondas a altas temperaturas facilitaron la liberación de azúcares reductores. Estos resultados permiten orientar las condiciones de extracción según el tipo de compuesto objetivo. Además, se observaron cambios en la turbidez y coloración del medio post-extracción, lo que sugiere una secreción activa de exopolisacáridos y metabolitos secundarios como respuesta adaptativa al estrés, lo cual refuerza la viabilidad de utilizar estrategias de cultivo con limitación de nutrientes para incrementar el rendimiento de compuestos de valor añadido.

El efecto de la deficiencia de N, P y S sobre la fisiología de la microalga, demostrando que dichas condiciones pueden ser aprovechadas para optimizar procesos productivos mediante la recuperación directa de azúcares solubles, reduciendo así la necesidad de métodos intensivos de disruptión celular y purificación. Esta estrategia representa una ventaja significativa para aplicaciones industriales, especialmente en bioenergía y biotecnología.

El modelo cuadrático propuesto es significativo para explicar la producción teórica de bioetanol, destacando la influencia del contenido de biomasa como el principal factor ( $A$  y  $A^2$ ). No obstante, se identificó una falta de ajuste significativa, lo cual sugiere que podrían existir otros factores no considerados en el modelo actual, por lo que se recomienda continuar con ajustes y validaciones para una mejor

representación del sistema.

Para el modelo de optimización, se utilizaron las condiciones donde se evaluaron los parámetros A, B y C en condiciones “en rango”, sin embargo, para mayor evaluación y parámetros con más variación al momento de optimizar, se puede considerar diferentes efectos de estos para minimizar los factores y obtener otros resultados.

Para el modelo de optimización se utilizaron condiciones en las que los parámetros A, B y C se evaluaron dentro de su rango operativo. No obstante, con el fin de ampliar la evaluación y explorar una mayor variabilidad en dichos parámetros, es posible considerar distintos efectos durante el proceso de optimización. Esto permitiría minimizar ciertos factores y obtener resultados alternativos

Estos hallazgos sientan las bases para el desarrollo de bioprocessos más eficientes, sustentables y orientados a la valorización integral de *A. platensis* y abren posibilidades para la implementación con otras cepas de microalgas.

## RECOMENDACIONES

Se enfatiza ampliar las pruebas de remediación ambiental utilizando *A. platensis* y otras microalgas halotolerantes, con diferentes tipos de efluentes provenientes de sistemas de ósmosis inversa, especialmente aquellos más concentrados en sales y compuestos inorgánicos. Es fundamental realizar ensayos tanto en condiciones controladas como en campo, para evaluar su eficacia real en contextos variables y con fluctuaciones ambientales. Esto permitirá validar su aplicabilidad en escenarios reales, identificando los límites de tolerancia y eficiencia en la reducción de dureza, además de abrir la posibilidad de escalar el proceso a nivel industrial.

Se sugiere establecer una línea de investigación enfocada en el estudio del estrés abiótico (salino, lumínico, térmico, entre otros) sobre *A. platensis* y otras microalgas potenciales, con énfasis en los cambios inducidos en la composición bioquímica de la biomasa (lípidos, carbohidratos, proteínas y metabolitos secundarios). Esta evaluación permitiría identificar condiciones de cultivo óptimas para maximizar la acumulación de compuestos de interés industrial, así como comprender mejor la resiliencia de las cepas seleccionadas ante cambios ambientales.

Para los procesos de fermentación orientados a la producción de bioetanol a partir de biomasa microalgal, se recomienda incorporar más variables de seguimiento como la medición de gases generados durante el proceso ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ), temperatura interna del sistema, pH en distintas fases, así como probar diferentes cepas de levaduras o incluso bacterias fermentadoras. También se sugiere explorar la adaptación o estrés inducido en las cepas fermentadoras para seleccionar aquellas con mayor resistencia a las concentraciones crecientes de bioetanol.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abou-Shady, A., Siddique, M. S., & Yu, W. (2023). A Critical Review of Recent Progress in Global Water Reuse during 2019–2021 and Perspectives to Overcome Future Water Crisis. *Environments*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/environments10090159>
2. Acosta Pérez, P. (2020). Aislamiento y caracterización molecular de los genes trealosa-6-fosfato sintetasa (TPS) y trealosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) y su relación en la tolerancia a estrés abiótico en plántulas de maíz (*Zea mays*). [Phd, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <https://doi.org/10.1/1080314173.pdf>
3. Aguilar Barajas, I., & Ramírez Orozco, A. I. (2015). Agua para Monterrey Logros, retos y oportunidades para Nuevo León y México. <https://hdl.handle.net/11285/642843>
4. Aguilar Rivera, N., Algara Siller, M., & Olvera Vargas, L. A. (2015). Gestión del agua como factor limitante de productividad cañera en México. *Revista de Geografía Norte Grande*, (60), 135-152. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34022015000100008>.
5. Ahmad, A., Banat, F., Alsafar, H., & Hasan, S. W. (2022). Algae biotechnology for industrial wastewater treatment, bioenergy production, and high-value bioproducts. *Science of The Total Environment*, 806, 150585. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150585>
6. Ahmad, I. Z. (2022). The usage of Cyanobacteria in wastewater treatment: prospects and limitations. *Letters in applied microbiology*, 75(4), 718-730. DOI:[10.1111/lam.13587](https://doi.org/10.1111/lam.13587)
7. Aikawa, S., Izumi, Y., Matsuda, F., Hasunuma, T., Chang, J. S., & Kondo, A. (2012). Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrosphaera platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. *Bioresource technology*, 108, 211-215. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.01.004](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.004)
8. Albergamo, V., Blankert, B., Cornelissen, E. R., Hofs, B., Knibbe, W. J., van der Meer, W., & de Voogt, P. (2019). Removal of polar organic micropollutants by pilot-scale reverse osmosis drinking water treatment. *Water research*, 148, 535-

545. DOI: [10.1016/j.watres.2018.09.029](https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.029)
9. Ali, A., Khalid, Z., & Ajarem, J. S. (2023). Wastewater treatment by using microalgae: Insights into fate, transport, and associated challenges. *Chemosphere*, 338, 139501. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2023.139501](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139501)
10. Ali, S. S., Mastropetros, S. G., Schagerl, M., Sakarika, M., Elsamahy, T., El-Sheekh, M., Sun, J., & Kornaros, M. (2022). Recent advances in wastewater microalgae-based biofuels production: A state-of-the-art review. *Energy Reports*, 8, 13253-13280. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2022.09.143>
11. Al-Jabri, H., Das, P., Thaher, M., Khan, S., & AbdulQuadir, M. (2021). Potential utilization of waste nitrogen fertilizer from a fertilizer industry using marine microalgae. *Science of The Total Environment*, 755, 142532. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142532>
12. Al-Obaidi, M., Kara-Zaitri, C., & Mujtaba, I. M. (2020). Wastewater treatment by reverse osmosis process. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003019343>
13. Alprol, A. E., Heneash, A. M. M., Ashour, M., Abualnaja, K. M., Alhashmialameer, D., Mansour, A. T., Sharawy, Z. Z., Abu-Saied, M. A., & Abomohra, A. E.-F. (2021). Potential Applications of *Arthrospira platensis* Lipid-Free Biomass in Bioremediation of Organic Dye from Industrial Textile Effluents and Its Influence on Marine Rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Materials*, 14(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/ma14164446>
14. American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation. (2022). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (24th ed.). APHA Press. <https://www.standardmethods.org>
15. Anis, S. F., Hashaikeh, R., & Hilal, N. (2019). Reverse osmosis pretreatment technologies and future trends: A comprehensive review. *Desalination*, 452, 159-195. DOI: [10.1016/j.desal.2018.11.006](https://doi.org/10.1016/j.desal.2018.11.006)
16. Ansari, F. A., Ravindran, B., Gupta, S. K., Nasr, M., Rawat, I., & Bux, F. (2019). Techno-economic estimation of wastewater phytoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus obliquus* microalgae. *Journal of Environmental Management*, 240, 293-302.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.123>

17. Arahou, F., Hassikou, R., Arahou, M., Rhazi, L., & Wahby, I. (2021). Influence of culture conditions on *Arthrospira platensis* growth and valorization of biomass as input for sustainable agriculture. *Aquaculture International*, 29(5), 2009-2020. DOI: [10.1007/s10499-021-00730-5](https://doi.org/10.1007/s10499-021-00730-5)
18. Arola, K., Van der Bruggen, B., Mänttäri, M., & Kallioinen, M. (2019). Treatment options for nanofiltration and reverse osmosis concentrates from municipal wastewater treatment: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(22), 2049-2116. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1594519>
19. Arreguin Cortes, F. I., Saavedra-Horita, J. R., Rodriguez-Varela, J. M., Tzatchkov, V. G., Cortez-Mejia, P. E., Llaguno-Guilberto, O. J., & Sainos-Candelario, A. (2020). State level water security indices in Mexico. *Sustainable Earth*, 3(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s42055-020-00031-4>
20. Ashokkumar, V., Salam, Z., Tiwari, O. N., Chinnasamy, S., Mohammed, S., & Ani, F. N. (2015). An integrated approach for biodiesel and bioethanol production from *Scenedesmus bijugatus* cultivated in a vertical tubular photobioreactor. *Energy Conversion and Management*, 101, 778-786. DOI: [10.1016/j.enconman.2015.06.006](https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.06.006)
21. Ávila, R., Justo, Á., Carrero, E., Crivillés, E., Vicent, T., & Blánquez, P. (2022). Water resource recovery coupling microalgae wastewater treatment and sludge co-digestion for bio-wastes valorisation at industrial pilot-scale. *Bioresource Technology*, 343, 126080. DOI: [10.1016/j.biortech.2021.126080](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126080)
22. Ayil Gutiérrez, B. A., Tamayo-Ordoñez, Y. J., Tamayo-Ordoñez, M. C., Córdova-Quiroz, A. V., Ríos-González, L. J., & Moreno-Davila, I. M. M. (2021). Consolidated Process for Bioenergy Production and Added Value Molecules from Microalgae. In *Handbook of Research on Bioenergy and Biomaterials* (pp. 229-251). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781003105053>
23. Ballicora, M. A., Iglesias AA, Preiss J (2003). ADP-Glucose Pyrophosphorylase, a Regulatory Enzyme for Bacterial Glycogen Synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.2.213-225.2003>

24. Barera, S., & Forlani, G. (2023). The role of proline in the adaptation of eukaryotic microalgae to environmental stress: An underestimated tool for the optimization of algal growth. *Journal of Applied Phycology*, 35(4), 1635-1648. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03017-9>
25. Bartels, C. R., Wilf, M., Andes, K., & long, J. (2005). Design considerations for wastewater treatment by reverse osmosis. *Water Science and Technology*, 51(6-7), 473-482. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0670>
26. Bautista Herrera, A., Ortiz-Arango, F., & Alvarez-Garcia, J. (2021). Profitability using second-generation bioethanol in gasoline produced in Mexico. *Energies*, 14(8), 2294. <https://doi.org/10.3390/en14082294>
27. BeMiller, J. N. (2017). Carbohydrate analysis. *Food analysis*, 333-360. DOI: [10.1007/978-3-319-45776-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_19)
28. Bernardo Vélez, J. L., Nieto-Molina, C. L., León-García, M. A., & Bravo-Mendoza, M. L. (2023). Enfoques de economía colaborativa y circular en Latinoamérica. *REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINARIA ARBITRADA YACHASUN*-ISSN: 2697-3456, 7(12 Ed. esp.), 105-112. Recuperado a partir de 25 de abril 2025 <https://editorialibkn.com/index.php/Yachasun/article/view/373>
29. Blanco Vieites, M., Suárez-Montes, D., Delgado, F., Álvarez-Gil, M., Battez, A. H., & Rodríguez, E. (2022). Removal of heavy metals and hydrocarbons by microalgae from wastewater in the steel industry. *Algal Research*, 64, 102700. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102700>
30. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. DOI: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
31. Braun, J. C. A., & Colla, L. M. (2023). Use of Microalgae for the Development of Biofertilizers and Biostimulants. *BioEnergy Research*, 16(1), 289-310. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10456-8>
32. Broda, M., Yelle, D. J., & Serwańska, K. (2022). Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass—Challenges and Solutions. *Molecules*, 27(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/molecules27248717>

33. Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., ... & Šantek, B. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food technology and biotechnology*, 56(3), 289-311. DOI: [10.17113/ftb.56.03.18.5546](https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546)
34. Calhoun, S., Bell, T. A. S., Dahlin, L. R., Kunde, Y., LaButti, K., Louie, K. B., Kuftin, A., Treen, D., Dilworth, D., Mihaltcheva, S., Daum, C., Bowen, B. P., Northen, T. R., Guarnieri, M. T., Starkenburg, S. R., & Grigoriev, I. V. (2021). A multi-omic characterization of temperature stress in a halotolerant *Scenedesmus* strain for algal biotechnology. *Communications Biology*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01859-y>
35. Carillo, P., & Gibon, Y. (2011). Protocol: extraction and determination of proline. PrometheusWiki, 2011, 1-5.
36. Carreira Casais, A., Otero, P., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A. G., Carpena, M., Soria-Lopez, A., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/ijerph18179153>
37. Carrillo Nieves, D., Alanís, M. J. R., de la Cruz Quiroz, R., Ruiz, H. A., Iqbal, H. M., & Parra-Saldívar, R. (2019). Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 102, 63-74. DOI: 10.1016/j.rser.2018.11.031
38. Carvalho, E. N., Júnior, A. C. P. B., & de Mendonça Brasil, A. C. (2023). Impact of electric vehicle emissions in the Brazilian scenario of energy transition and use of bioethanol. *Energy Reports*, 10, 2582-2596. [10.1016/j.egyr.2023.09.045](https://doi.org/10.1016/j.egyr.2023.09.045)
39. Chanda, M., Merghoub, N., & EL Arroussi, H. (2019). Microalgae polysaccharides: The new sustainable bioactive products for the development of plant bio-stimulants? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 177. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2745-3>
40. Chang, I. C. C., & Sheppard, E. (2013). China's eco-cities as variegated urban sustainability: Dongtan eco-city and Chongming eco-island. *Journal of Urban*

Technology, 20(1), 57-75. DOI:[10.1080/10630732.2012.735104](https://doi.org/10.1080/10630732.2012.735104)

41. Chang, M., & Liu, K. (2024). *A. platensis* as future food: A review on functional ingredients, bioactivities and application in the food industry. International Journal of Food Science and Technology, 59(3), 1197-1212.  
<https://doi.org/10.1111/ijfs.16882>
42. Chen, H., & Fu, X. (2016). Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 57, 468-478. DOI:[10.1016/j.rser.2015.12.069](https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.069)
43. Cheng, D., & He, Q. (2014). Assessment of environmental stresses for enhanced microalgal biofuel production—an overview. Frontiers in energy research, 2, 26. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00026>
44. Chentir, I., Doumandji, A., Ammar, J. et al. Induced change in *Arthrospira* sp. (*Spirulina*) intracellular and extracellular metabolites using multifactor stress combination approach. J Appl Phycol 30, 1563–1574 (2018).  
<https://doi.org/10.1007/s10811-017-1348-3>
45. Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., ... & Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: high value products perspectives. Bioresource technology, 229, 53-62. DOI: [10.1016/j.biortech.2017.01.006](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006)
46. Chia, S. R., Chew, K. W., Show, P. L., Yap, Y. J., Ong, H. C., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018). Analysis of economic and environmental aspects of microalgae biorefinery for biofuels production: a review. Biotechnology journal, 13(6), 1700618. DOI: [10.1002/biot.201700618](https://doi.org/10.1002/biot.201700618)
47. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, 25(3), 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
48. Cortés Ruiz, A., & Azuz-Adeath, I. (2021). Estimating the future hydric needs of Baja California, Mexico. Assessment of scenarios to stop being a region with water scarcity. Water Supply, 21(6), 2760-2771.  
<https://doi.org/10.2166/ws.2020.198>
49. Ding, L., Cheng, J., Lu, H., Yue, L., Zhou, J., & Cen, K. (2017). Three-stage gaseous biofuel production combining dark hydrogen, photo hydrogen, and methane fermentation using wet *Arthrospira platensis* cultivated under high CO<sub>2</sub>

- and sodium stress. *Energy Conversion and Management*, 148, 394-404.  
<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.05.079>
50. Do, J. M., Jo, S. W., Yeo, H. T., Shin, D. H., Oh, H., Hong, J. W., & Yoon, H. S. (2021). Biological treatment of reverse osmosis concentrate by microalgae cultivation and utilization of the resulting algal biomass. *Journal of Water Process Engineering*, 42, 102157. DOI:[10.1016/j.jwpe.2021.102157](https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102157)
51. Edeh, I. (2021). Bioethanol production: An overview. *Bioethanol technologies*, 1. DOI:[10.5772/intechopen.94895](https://doi.org/10.5772/intechopen.94895)
52. Elavarthi, S., & Martin, B. (2010). Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. In *Plant stress tolerance: methods and protocols* (pp. 273-280). Totowa, NJ: Humana Press. DOI: [10.1007/978-1-60761-702-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_16)
53. El-Dalatony, M. M., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A., Kim, H., Salama, E. S., & Jeon, B. H. (2016). Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 219, 98-105. DOI: [10.1016/j.biortech.2016.07.113](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.113)
54. El-Mekkawi, S. A., Abdo, S. M., Samhan, F. A., & Ali, G. H. (2019). Optimization of some fermentation conditions for bioethanol production from microalgae using response surface method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0205-8>
55. El-Shouny, W., Sharaf, M., Abomohra, A. E. F., & Abo-Eleneen, M. A. E. (2024). Production enhancement of some valuable compounds of *Arthrospira platensis*. *Journal of Basic and Environmental Sciences*, 2(3), 74-83. DOI:[10.21608/jbes.2024.369588](https://doi.org/10.21608/jbes.2024.369588)
56. Esquivel-Hernández, D. A., Pennacchio, A., Torres-Acosta, M. A., Parra-Saldívar, R., de Souza Vandenberghe, L. P., & Faraco, V. (2021). Multi-product biorefinery from *Arthrospira platensis* biomass as feedstock for bioethanol and lactic acid production. *Scientific Reports*, 11(1), 19309. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97803-5>
57. Fierro, A., Forte, A., Zucaro, A., Micera, R., & Giampietro, M. (2019). Multi-scale integrated assessment of second-generation bioethanol for transport sector in

- the Campania Region. Journal of cleaner production, 217, 409-422.  
DOI:[10.1016/j.jclepro.2019.01.244](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.244)
58. García López, J. I. (2019). Respuestas fisiológicas y bioquímicas inducidas por nanopartículas de ZnO en semillas y plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq) (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).  
URI: <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/20059>
59. Garud, R. M., Kore, S. V., Kore, V. S., & Kulkarni, G. S. (2011). A Short Review on Process and Applications of Reverse Osmosis. Universal Journal of Environmental Research & Technology, 1(3).
60. Gentscheva, G., Nikolova, K., Panayotova, V., Peycheva, K., Makedonski, L., Slavov, P., Radusheva, P., Petrova, P., & Yotkovska, I. (2023). Application of *Arthrospira platensis* for Medicinal Purposes and the Food Industry: A Review of the Literature. Life, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/life13030845>
61. González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2008). Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters. Applied microbiology and biotechnology, 80(5), 891-898.  
DOI: [10.1007/s00253-008-1571-6](https://doi.org/10.1007/s00253-008-1571-6)
62. Gonzalez, E., & Laroche, C. (2021). *A. platensis* as a feasible feedstock for bioethanol production. Applied Sciences, 11(15), 6756.  
<https://doi.org/10.3390/app11156756>
63. Guerra Cobián, V. H., Ferriño-Fierro, A. L., Yépez-Rincón, F. D., Cavazos-González, R. A., & Rodríguez-Rodríguez, J. de D. (2020). Status of Regional Drinking Water Services in Nuevo Leon, Mexico. En E. M. Otazo-Sánchez, A. E. Navarro-Frómeta, & V. P. Singh (Eds.), Water Availability and Management in Mexico (pp. 323-349). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-24962-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24962-5_16)
64. Guo, M., Li, C., Facciotto, G., Bergante, S., Bhatia, R., Comolli, R., Ferré, C., & Murphy, R. (2015). Bioethanol from poplar clone Imola: An environmentally viable alternative to fossil fuel? Biotechnology for Biofuels, 8(1), 134.  
<https://doi.org/10.1186/s13068-015-0318-8>
65. Harun, R., & Danquah, M. K. (2011a). Enzymatic hydrolysis of microalgal

- biomass for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 168(3), 1079-1084. DOI:[10.1016/j.cej.2011.01.088](https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.088)
66. Harun, R., & Danquah, M. K. (2011b). Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, 46(1), 304-309. DOI:[10.1016/j.procbio.2010.08.027](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.027)
67. Harun, R., Danquah, M. K., & Forde, G. M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for ethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(2), 199-203. DOI:[10.1002/jctb.2287](https://doi.org/10.1002/jctb.2287)
68. Hena, S., Znad, H., Heong, K. T., & Judd, S. (2018). Dairy farm wastewater treatment and lipid accumulation by *Arthrospira platensis*. *Water Research*, 128, 267-277. DOI: [10.1016/j.watres.2017.10.057](https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.057)
69. Hernández, C., Escamilla-Alvarado, C., Sánchez, A., Alarcón, E., Ziarelli, F., Musule, R., & Valdez-Vazquez, I. (2019). Wheat straw, corn stover, sugarcane, and Agave biomasses: chemical properties, availability, and cellulosic-bioethanol production potential in Mexico. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(5), 1143-1159. DOI:[10.1002/bbb.2017](https://doi.org/10.1002/bbb.2017)
70. Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource technology*, 135, 191-198. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.10.015](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015)
71. Hommes, L., Boelens, R., Bleeker, S., Duarte-Abadía, B., Stolttenborg, D., & Vos, J. (2020). Water governmentalities: The shaping of hydrosocial territories, water transfers and rural–urban subjects in Latin America. *Environment and Planning E*, 3(2), 399-422. <https://doi.org/10.1177/2514848619886255>
72. Horst, D. J., Petter, R. R., & Behainne, J. J. R. (2011). Comparative analysis of different acids utilization for cellulosic hydrolysis by using Brazilian wood wastes for fibers and bioethanol production yields. *Revista Gestão Industrial*, 7(2). D.O.I.: 10.3895/S1808-04482011000200007
73. Ibrahim, O. O. (2023). Recent advances fermentation technology for bioethanol production as one of potential energy sources. *Recent Prog. Sci. Technol.*, 4, 22-48. DOI:[10.9734/bpi/rpst/v4/4333B](https://doi.org/10.9734/bpi/rpst/v4/4333B)

74. IEA (2020). Power Systems in Transition, IEA, Paris. Recuperado el 27 de abril 2025 de <https://www.iea.org/reports/power-systems-in-transition>
75. Jaramillo Obando, J. J. (2011). Evaluación tecno-económica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas (Doctoral dissertation).
76. Juin, C., Chérouvrier, J. R., Thiéry, V., Gagez, A. L., Bérard, J. B., Joguet, N., ... & Picot, L. (2015). Microwave-assisted extraction of phycobiliproteins from *Porphyridium purpureum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(1), 1-15. DOI: [10.1007/s12010-014-1250-2](https://doi.org/10.1007/s12010-014-1250-2)
77. Kapoore, R. V., Wood, E. E., & Llewellyn, C. A. (2021). Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnology Advances*, 49, 107754. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107754>
78. Koyande, A. K., Chew, K. W., Manickam, S., Chang, J.-S., & Show, P.-L. (2021). Emerging algal nanotechnology for high-value compounds: A direction to future food production. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 290-302. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.026>
79. Kucera, J. (2023). Reverse osmosis. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119725183>
80. Kumar, D., & Singh, V. (2019). Bioethanol production from corn. In Corn (pp. 615-631). AACC International Press. DOI: [10.1016/B978-0-12-811971-6.00022-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00022-X)
81. Kumar, D., Juneja, A., & Singh, V. (2018). Fermentation technology to improve productivity in dry grind corn process for bioethanol production. *Fuel processing technology*, 173, 66-74. DOI: [10.1016/j.fuproc.2018.01.014](https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2018.01.014)
82. Kumaresan, V., Nizam, F., Ravichandran, G., Viswanathan, K., Palanisamy, R., Bhatt, P., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Mala, K., & Arockiaraj, J. (2017). Transcriptome changes of blue-green algae, *Arthrospira* sp. In response to sulfate stress. *Algal Research*, 23, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.012>
83. Laboratorio Central de Calidad de Aguas. Agua y Drenaje de Monterrey. Nuevo León. (s. f.). Calidad del agua suministrada a través de la red durante el primer

semestre del 2023. Recuperado el 20 abril 2024 de  
<https://pfiles.sadm.gob.mx/PFiles/reportes/reportes?pro=25>

84. Lakatos, G. E., Ranglová, K., Manoel, J. C., Grivalský, T., Kopecký, J., & Masojídek, J. (2019). Bioethanol production from microalgae polysaccharides. *Folia microbiologica*, 64, 627-644. DOI: [10.1007/s12223-019-00732-0](https://doi.org/10.1007/s12223-019-00732-0)
85. Larson, R. (2021). La resolución de la ONU sobre el derecho humano al agua después de una década. *Iuris Dictio*, 27, 21-38.  
<http://dx.doi.org/10.18272/iu.v27i27.2079>
86. Laurens, L. M., Chen-Glasser, M., & McMillan, J. D. (2017). A perspective on renewable bioenergy from photosynthetic algae as feedstock for biofuels and bioproducts. *Algal Research*, 24, 261-264.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.002>
87. Lee, J. H., Lee, H. U., Lee, J. H., Lee, S. K., Yoo, H. Y., Park, C., & Kim, S. W. (2019). Continuous production of bioethanol using microalgal sugars extracted from *Nannochloropsis gaditana*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 36(1), 71-76. <https://doi.org/10.1007/s11814-018-0173-y>
88. Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in energy and combustion science*, 38(4), 449-467. DOI: [10.1016/j.pecs.2012.03.002](https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002)
89. Littlewood, J., Guo, M., Boerjan, W., & Murphy, R. J. (2014). Bioethanol from poplar: A commercially viable alternative to fossil fuel in the European Union. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-113>
90. Ljubic, A., Safafar, H., Holdt, S. L., & Jacobsen, C. (2018). Biomass composition of *A. platensis* during cultivation on industrial process water and harvesting. *Journal of Applied Phycology*, 30, 943-954. DOI: [10.1007/s10811-017-1332-y](https://doi.org/10.1007/s10811-017-1332-y)
91. López Ortega, M. G., Guadalajara, Y., Junqueira, T. L., Sampaio, I. L., Bonomi, A., & Sánchez, A. (2021). Sustainability analysis of bioethanol production in Mexico by a retrofitted sugarcane industry based on the Brazilian expertise. *Energy*, 232, 121056. DOI: [10.1016/j.energy.2021.121056](https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.121056)
92. Magnani, L., Gaydou, E. M., & Hubaud, J. C. (2000). Spectrophotometric

- measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Analytica Chimica Acta*, 411(1-2), 209-216. DOI:[10.1016/S0003-2670\(00\)00717-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00717-0)
93. Malaeb, L., & Ayoub, G. M. (2011). Reverse osmosis technology for water treatment: State of the art review. *Desalination*, 267(1), 1-8. DOI:[10.1016/j.desal.2010.09.001](https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.09.001)
94. Malça, J., & Freire, F. (2006). Renewability and life-cycle energy efficiency of bioethanol and bio-ethyl tertiary butyl ether (bioETBE): assessing the implications of allocation. *Energy*, 31(15), 3362-3380. DOI: [10.1016/j.energy.2006.03.013](https://doi.org/10.1016/j.energy.2006.03.013)
95. Ma'mun, S., Prasetio, M. W., Anugrah, A. R., Ruliandi, A. P., & Pramuwardani, D. (2024). Bioethanol from *Arthrospira platensis* biomass using a combined pretreatment. *Chemical Engineering Journal Advances*, 19, 100616. DOI:[10.1016/j.ceja.2024.100616](https://doi.org/10.1016/j.ceja.2024.100616)
96. Manochio, C., Andrade, B. R., Rodriguez, R. P., & Moraes, B. S. (2017). Ethanol from biomass: A comparative overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 743-755. DOI:[10.1016/j.rser.2017.05.063](https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.063)
97. Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47(3), 469-474. DOI: [10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x)
98. Markou, G. (2012). Alteration of the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresource technology*, 116, 533-535. DOI:[10.1016/j.biortech.2012.04.022](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.022)
99. Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2013). Carbohydrate-enriched cyanobacterial biomass as feedstock for bio-methane production through anaerobic digestion. *Fuel*, 111, 872-879. DOI:[10.1016/j.fuel.2013.04.013](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.013)
100. Markou, G., Kougia, E., Arapoglou, D., Chentir, I., Andreou, V., & Tzovenis, I. (2023). Production of *A. platensis*: Effects on growth and biochemical composition of long-term acclimatization at different salinities. *Bioengineering*, 10(2), 233. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020233>

101. Martins, P. L., Duarte, L. C., Pereira, H., Reis, A., & Carvalheiro, F. (2025). Evaluation of different fractionation methods for the simultaneous protein and carbohydrate extraction from microalgae. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(1), 999-1011. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05279-w>
102. Mignogna, D., Szabó, M., Ceci, P., & Avino, P. (2024). Biomass energy and biofuels: Perspective, potentials, and challenges in the energy transition. *Sustainability*, 16(16), 7036. <https://doi.org/10.3390/su16167036>
103. Milia, M., Corrias, F., Addis, P., Chini Zitelli, G., Cicchi, B., Torzillo, G., Andreotti, V., & Angioni, A. (2022). Influence of Different Light Sources on the Biochemical Composition of Arthrospira spp. Grown in Model Systems. *Foods*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/foods11030399>
104. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
105. Mirzaei, M., Jazini, M., Aminiershad, G., & Refardt, D. (2024). Biodesalination of saline aquaculture wastewater with simultaneous nutrient removal and biomass production using the microalgae Arthrospira and Dunaliella in a circular economy approach. *Desalination*, 581, 117564. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2024.117564>
106. Mondal, S., & Wickramasinghe, S. R. (2008). Produced water treatment by nanofiltration and reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science*, 322(1), 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.05.039>
107. Mondal, S., Bera, S., Mishra, R., & Roy, S. (2022). Redefining the role of microalgae in industrial wastewater remediation. *Energy Nexus*, 6, 100088. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100088>
108. Morante Carballo, F., Montalván-Burbano, N., Quiñonez-Barzola, X., Jaya-Montalvo, M., & Carrión-Mero, P. (2022). What Do We Know about Water Scarcity in Semi-Arid Zones? A Global Analysis and Research Trends. *Water*, 14(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/w14172685>.
109. Muhamad, A., Noor, S. F. M., Syahirah, N., Hamid, A. I., & Zaidi, M. A. H. M. (2021). Physical factors optimization of *saccharomyces cerevisiae* fermentation

- to enhance production of bioethanol: a review. *Multidisciplinary Applied Research and Innovation*, 2(2), 266-277.
110. Naciones Unidas. (2015). Objetivos y metas de desarrollo sostenible. Recuperado el 7 de abril de 2025, de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
111. National Institute of Standards and Technology. (s.f.a). 1.3.5.16. Kolmogorov-Smirnov Goodness-of-Fit Test NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods. Recuperado el 27 de abril de 2025 <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda35g.htm>
112. National Institute of Standards and Technology. (s.f.b). 7.2.1.3. What are residuals? NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods Recuperado el 27 de abril de 2025. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/prc/section2/prc213.htm>
113. Niccolai, A., Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2019). Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Research*, 42, 101617. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101617>
114. Niphadkar, S., Bagade, P., & Ahmed, S. (2018). Bioethanol production: Insight into past, present and future perspectives. *Biofuels*, 9(2), 229-238. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1334338>
115. Onyeaka, H., Mansa, R. F., Wong, C. M. V. L., & Miri, T. (2022). Bioconversion of starch base food waste into bioethanol. *Sustainability*, 14(18), 11401. <https://doi.org/10.3390/su141811401>
116. Ozdinguis, A. G. B., & Kocar, G. (2018). Current and future aspects of bioethanol production and utilization in Turkey. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, 2196-2203. DOI: 10.1016/j.rser.2017.06.031
118. Panahi, H. K. S., Dehhaghi, M., Guillemin, G. J., Gupta, V. K., Lam, S. S., Aghbashlo, M., & Tabatabaei, M. (2022). Bioethanol production from food wastes rich in carbohydrates. *Current Opinion in Food Science*, 43, 71-81. DOI: [10.1016/j.cofs.2021.11.001](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.11.001)
119. Papadopoulos, K. P., Economou, C. N., Markou, G., Nicodemou, A., Koutinas,

- M., Tekerlekopoulou, A. G., & Vayenas, D. V. (2022). Cultivation of Arthrospira platensis in brewery wastewater. *Water*, 14(10), 1547. DOI: <https://doi.org/10.3390/w14101547>
120. Phwan, C. K., Chew, K. W., Sebayang, A. H., Ong, H. C., Ling, T. C., Malek, M. A., ... & Show, P. L. (2019). Effects of acids pre-treatment on the microbial fermentation process for bioethanol production from microalgae. *Biotechnology for biofuels*, 12, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1533-5>
121. Phwan, C. K., Ong, H. C., Chen, W. H., Ling, T. C., Ng, E. P., & Show, P. L. (2018). Overview: comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 173, 81-94. DOI: [10.1016/j.enconman.2018.07.054](https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.07.054)
122. Pilarski, K., Pilarska, A. A., Boniecki, P., Niedbała, G., Witaszek, K., Piekutowska, M., ... & Wawrzyniak, A. (2021). Degree of biomass conversion in the integrated production of bioethanol and biogas. *Energies*, 14(22), 7763. <https://doi.org/10.3390/en14227763>
123. Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource technology*, 102(1), 17-25. DOI: [10.1016/j.biortech.2010.06.035](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035)
124. Quiroga, C., & Castelblanco, A. (2024). Beyond Water Justice and Water Security: Debates on water, women, and climate change in Latin America. In Routledge Handbook of Gender and Water Governance. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781003100379-32>
125. Reijnders, L., & Huijbregts, M. A. J. (2007). Life cycle greenhouse gas emissions, fossil fuel demand and solar energy conversion efficiency in European bioethanol production for automotive purposes. *Journal of Cleaner Production*, 15(18), 1806-1812. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2006.05.007>
126. Rempel, A., Nadal Biolchi, G., Farezin Antunes, A. C., Gutkoski, J. P., Treichel, H., & Colla, L. M. (2021). Cultivation of Microalgae in Media Added of Emergent Pollutants and Effect on Growth, Chemical Composition, and Use of Biomass to Enzymatic Hydrolysis. *BioEnergy Research*, 14(1), 265-277. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10177-w>

127. Robak, K., & Balcerk, M. (2018). Review of second-generation bioethanol production from residual biomass. *Food technology and biotechnology*, 56(2), 174. DOI: [10.17113/ftb.56.02.18.5428](https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5428)
128. Rout, P. R., Zhang, T. C., Bhunia, P., & Surampalli, R. Y. (2021). Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. *Science of The Total Environment*, 753, 141990. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141990>
129. Rubio, C., Dominik-Jakubiec, M., Paz, S. et al. Dietary exposure to trace elements (B, Ba, Li, Ni, Sr, and V) and toxic metals (Al, Cd, and Pb) from the consumption of commercial preparations of *Spirulina platensis*. *Environ Sci Pollut Res* 28, 22146–22155 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12260-3>
130. SADM, S. D. A., & Drenaje de Monterrey, I. P. D. (2017). Resultados de la evaluación de desempeño. Cuenta pública 2017. Recuperado el 27 de abril del 2025 de <https://pfiles.sadm.gob.mx/Pfiles/Indicadores/Consulta?idseccion=4>
131. Sahle Demessie, E., Aly Hassan, A., & El Badawy, A. (2019). Bio-desalination of brackish and seawater using halophytic algae. *Desalination*, 465, 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2019.05.002>
132. Saranraj, P., & Sivasakthi, S. (2014). *Spirulina platensis*—food for future: a review. *Asian J. Pharm. Sci. Technol*, 4(1), 26-33. Print ISSN: 2248 – 9177
133. Secretaría de Salud. (2021). *Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización (NOM-127-SSA1-2021)*. Diario Oficial de la Federación. [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5656237&fecha=10/01/2022#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5656237&fecha=10/01/2022#gsc.tab=0)
134. Shakelly, N., Pérez-Cardona, J. R., Deng, S., Maani, T., Li, Z., & Sutherland, J. W. (2023). Comparative life cycle assessment of bioethanol production from different generations of biomass and waste feedstocks. *Procedia CIRP*, 116, 630-635 DOI:[10.1016/j.procir.2023.02.106](https://doi.org/10.1016/j.procir.2023.02.106)
135. Sharma, B., Larroche, C., & Dussap, C. G. (2020). Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource technology*, 313, 123630.

DOI: [10.1016/j.biortech.2020.123630](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630)

136. Silva, J. S., Mendes, J. S., Correia, J. A. C., Rocha, M. V. P., & Micoli, L. (2018). Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process. *Journal of biotechnology*, 286, 71-78.  
DOI: [10.1016/j.jbiotec.2018.09.004](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.09.004)
137. Susmozas, A., Martín-Sampedro, R., Ibarra, D., Eugenio, M. E., Iglesias, R., Manzanares, P., & Moreno, A. D. (2020). Process strategies for the transition of 1G to advanced bioethanol production. *Processes*, 8(10), 1310. <https://doi.org/10.3390/pr8101310>
138. Swana, J., Yang, Y., Behnam, M., & Thompson, R. (2011). An analysis of net energy production and feedstock availability for biobutanol and bioethanol. *Bioresource technology*, 102(2), 2112-2117. DOI: [10.1016/j.biortech.2010.08.051](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.051)
139. Tabah, B., Pulidindi, I. N., Chitturi, V. R., Arava, L. M. R., Varvak, A., Foran, E., & Gedanken, A. (2017). Solar-energy-driven conversion of biomass to bioethanol: a sustainable approach. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(30), 15486-15506. <https://doi.org/10.1039/C7TA03083E>
140. Tayyab, M., Noman, A., Islam, W., Waheed, S., Arafat, Y., Ali, F., ... & Lin, W. (2018). Bioethanol production from lignocellulosic biomass by environment-friendly pretreatment methods: a review. *Applied Ecology & Environmental Research*, 16(1). DOI: [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1601\\_225249](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1601_225249)
141. Thangsiri, S., Inthachat, W., Temviriyankul, P., Sahasakul, Y., Trisonthi, P., Pan-utai, W., Siriwan, D., & Suttisansanee, U. (2024). Bioactive compounds and in vitro biological properties of *Arthrosphaera platensis* and *Athrosphaera maxima*: A comparative study. *Scientific Reports*, 14(1), 23786. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-74492-4>
142. Toor, M., Kumar, S. S., Malyan, S. K., Bishnoi, N. R., Mathimani, T., Rajendran, K., & Pugazhendhi, A. (2020). An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Chemosphere*, 242, 125080. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.125080](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125080)
143. Trewavas, A. J., Rodrigues, C., Rato, C., & Malhó, R. (2002). Cyclic

- nucleotides: the current dilemma. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5), 425-429. DOI: [10.1016/s1369-5266\(02\)00281-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00281-9)
144. Velazquez Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R. M., Colla, L. M., Sáenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, D. E., Aguilar, C. N., ... & Ruiz, H. A. (2018). Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. DOI: [10.18331/BRJ2018.5.1.5](https://doi.org/10.18331/BRJ2018.5.1.5)
145. Vinardell, S., Astals, S., Mata-Alvarez, J., & Dosta, J. (2020). Techno-economic analysis of combining forward osmosis-reverse osmosis and anaerobic membrane bioreactor technologies for municipal wastewater treatment and water production. *Bioresource technology*, 297, 122395. DOI: [10.1016/j.biortech.2019.122395](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122395)
146. Wu, H., Li, T., Lv, J., Chen, Z., Wu, J., Wang, N., ... & Xiang, W. (2021). Growth and biochemical composition characteristics of *A. platensis* induced by simultaneous nitrogen deficiency and seawater-supplemented medium in an outdoor raceway pond in winter. *Foods*, 10(12), 2974. <https://doi.org/10.3390/foods10122974>
147. Yang, Z., Zhou, Y., Feng, Z., Rui, X., Zhang, T., & Zhang, Z. (2019). A review on reverse osmosis and nanofiltration membranes for water purification. *Polymers*, 11(8), 1252. <https://doi.org/10.3390/polym11081252>
148. Yao, C., Chu, Y., Liu, Y., & Cao, X. (2017). Photosynthetic performance in relation to nitrogen limitation-induced starch production in a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis*. *Res. Rev. J. Bot. Sci.*, 6(4), 57-63. p-ISSN:2347-2308
149. Yoshikawa, K., Aikawa, S., Kojima, Y., Toya, Y., Furusawa, C., Kondo, A., & Shimizu, H. (2015). Construction of a genome-scale metabolic model of *Arthrospira platensis* NIES-39 and metabolic design for cyanobacterial bioproduction. *PLoS One*, 10(12), e0144430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144430>
150. Zarrouk, C. (1966). Contribution a l'étude d'une Cyanophycee. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Thesis. University of Paris, France.

151.Zou, T.-B., Jia, Q., Li, H.-W., Wang, C.-X., & Wu, H.-F. (2013). Response Surface Methodology for Ultrasound-Assisted Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Marine Drugs*, 11(5), Article 5.  
<https://doi.org/10.3390/md11051644>