

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



INSTITUTO DE INGENIERÍA
Universidad Autónoma de Baja California
EXCELENCIA E INNOVACIÓN EN INGENIERÍA

"Comparación de la susceptibilidad a la contaminación microbiológica en los FAMEs sintetizados a partir de manteca residual y refinada durante el almacenamiento simulado."

TESINA

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:

SAMUEL LEPE DE ALBA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CONRADO GARCÍA GONZÁLEZ

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. ARMANDO PÉREZ SÁNCHEZ

Mexicali, Baja California,

Octubre de 2025

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado, por apoyarme para realizar este trabajo y por la formación que se me dio.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, por otorgarme la beca para realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco a mis directores de tesis el Dr. Conrado García González y el Dr. Armando Pérez Sánchez, que me hayan aceptado como su alumno, por su orientación y apoyo durante este tiempo.

Agradezco también a la Dra. Mónica Carrillo Beltrán y al Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez por su apoyo y guía, por apoyarme en el uso de las instalaciones y por compartir su conocimiento y experiencia.

Agradezco también a la M.I Luz Estela Salazar Escalante, por apoyarme cuando necesitaba.

Agradezco también a Manuel Zamudio Núñez, por apoyarme durante mis estudios de maestría y doctorado, por la paciencia y por estar en los momentos más difíciles que fueron varios, pero se logró.

Y a los sínodos por su tiempo y paciencia en la revisión de esta disertación de tesis.

CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	5
Abstract	5
1. Introducción	6
1.1 Producción de biodiesel	7
2. Materiales y métodos	10
2.1 Reactivos	10
2.2 Materiales	10
2.3 Síntesis de FAME	10
2.4 Purificación de FAME	10
2.5 Muestras y Aislamiento Microbiológico	12
2.6 Ensayo de espectrometría de masas MALDI-TOF	14
3. Resultados	15
3.1 Síntesis y purificación de FAME	15
3.2 Perfiles microbianos de las muestras recolectadas	17
3.3 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF MS	19
4. Discusión	20
5. Conclusiones	24
6. Referencias	25
7. Anexos	30
7.1 Otros productos académicos	30
7.1.1 Artículo como primer autor, titulado “Extraction Methods and Applications of Bioactive Compounds from Neem (<i>Azadirachta indica</i>): A Mini-Review”	30
7.1.2 Artículo como primer autor, titulado “Comparison of Susceptibility to Microbiological Contamination in FAMEs Synthesized from Residual and Refined Lard During Simulated Storage”	31
7.1.3 Artículo como primer autor, aceptado para publicarse en la revista IEEE, titulado “Comparision of oxidative stability indices between residual and refined lard”.	32
7.1.4 Artículo como co-autor, aceptado para publicarse en la revista IEEE titulado “Corrosion Performance of copper in crude bioglycerol: Implications for biodiesel infrastructure”.	33
7.1.5 Participación en un congreso internacional CICITEC con el tema “Síntesis de biodiesel por método alcalino a partir de distintas fuentes de aceites vegetales y grasas animales”	35
7.1.6 Participación en un congreso internacional CICITEC con el tema “Comparison of the microbiological attack of biodiesel produced from different sources”	36
7.1.7 Participación en una ponencia como expositor con el tema “Problemática de la industria del biodiesel por contaminación microbiana”.	37
7.1.8 Participación en una ponencia como expositor con el tema “Determinación de propiedades antimicrobiológicas (<i>Azadirachta indica</i>), para su potencial uso como biocida en el biodiesel”	38

Resumen

La presente investigación muestra un diseño experimental comparativo y tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad a la contaminación microbiana en los ésteres metílicos de ácidos grasos (por sus siglas en inglés FAMEs) y en la interfaz FAME–agua de manteca residual y refinada, simulando condiciones de almacenamiento a gran escala como parte de la cadena de suministro de combustible, así como identificar los microorganismos desarrollados. Las cajas Petri fueron sembradas conforme a la norma ASTM E-1259 y siguiendo las instrucciones del fabricante del agar Bushnell Haas. Se observó crecimiento microbiológico en la interfaz FAME–agua del FAME obtenido a partir de manteca residual. Mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF, se identificaron las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptomyces violaceoruber* en los FAMEs de manteca residual, siendo esta última previamente reportada en FAMEs. Las implicaciones del desarrollo de microorganismos sobre la calidad fisicoquímica de los FAMEs son significativas, ya que provocan un aumento en el índice de acidez, lo cual puede afectar negativamente a los metales al inducir corrosión. Los FAMEs de manteca refinada no mostraron desarrollo de microorganismos. La investigación concluyó que la manteca residual tiende a ser más propensa al ataque microbiológico si las condiciones de humedad y temperatura favorecen el crecimiento microbiano. La manteca refinada es menos susceptible a la contaminación microbiana debido a que se le añaden antioxidantes. Los hallazgos contribuirán a la base de conocimiento para una introducción más segura de los FAMEs en la matriz de biocombustibles.

Palabras clave: FAMEs, MALDITOF, *Pseudomona aeruginosa*, *Streptomyces violaceoruber*, biodiesel

Abstract

The present research features an experimental comparative design and the objective of this work was to determine the susceptibility to microbiological contamination in fatty acid methyl esters (FAMEs) and the FAME–water interface of residual and refined lard, large volume simulating storage conditions as fuel supply

chain, and to identify the microorganisms developed. The Petri dishes were seeded according to ASTM E-1259 and the instructions provided by the manufacturer of the Bushnell Haas agar. Microbiological growth was observed at the FAME–water interface of FAME obtained from residual lard. Using the MALDI-TOF mass spectrometry technique, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptomyces violaceoruber* bacteria were identified in the residual lard FAMEs, with the latter being previously reported in FAMEs. The implications of microorganism development on the physicochemical quality of FAMEs are significant, as it leads to an increase in the acid index, which may negatively impact metals by inducing corrosion. The refined lard FAMEs did not show any development of microorganisms. The present research concluded that residual lard tends to be more prone to microbiological attack if the conditions of moisture and temperature affect microbial growth. Refined tallow exhibits reduced susceptibility to microbial contamination due to the incorporation of antioxidants. These findings contribute to the growing body of knowledge supporting the safer integration of fatty acid methyl esters (FAMEs) into biofuel matrices.

Key Words: FAMEs, MALDITOF, *Pseudomona aeruginosa*, *Streptomyces violaceoruber*, biodifuels

1. Introducción

Los biocombustibles se consideran, en parte, una solución a problemas como el desarrollo sostenible, la seguridad energética y la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero. El biodiesel, es un combustible respetuoso con el medio ambiente y similar al petrodiesel en cuanto a propiedades de combustión, ha recibido una atención considerable en los últimos tiempos a nivel mundial. El biodiesel es un éster metílico o etílico de ácido graso producido a partir de recursos biológicos renovables como aceites vegetales (tanto comestibles como no comestibles), aceite vegetal residual y grasas animales (1).

El biodiesel se sintetiza mediante la transesterificación de materias primas lipídicas con alcoholes de bajo peso molecular. Actualmente, se utilizan bases alcalinas para catalizar la reacción (2).

1.1 Producción de biodiesel

La transesterificación es el proceso más utilizado a escala industrial ya que solo se requieren tres materias primas para producirlo: material graso, aceite y alcohol. Este procedimiento ha demostrado ser capaz de producir biodiesel de buena calidad, dependiendo de la materia lipídica utilizada, esta reacción consiste en la transformación de los triglicéridos contenidos en los aceites, un alcohol y un catalizador para obtener ésteres mono alquílicos de ácidos grasos (FAMES). La reacción de transesterificación requiere el uso de una materia prima lipídica con alto grado de pureza, esta reacción consta de tres etapas: la conversión de triglicéridos en diglicéridos estos en monoglicéridos y finalmente la obtención de glicerol (3). Esta reacción se presenta en la figura 1.

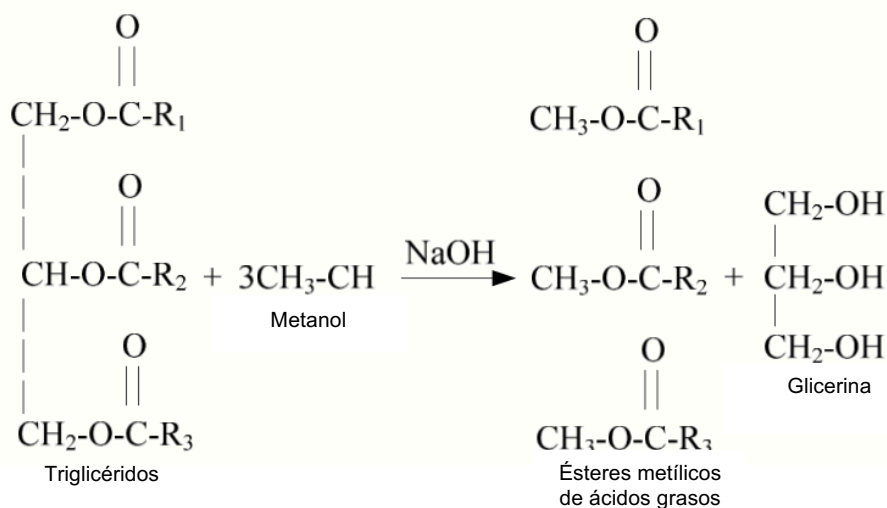


Fig. 1. Reacción para la producción de biodiesel (4).

Los biocombustibles de primera generación se obtienen a partir de diferentes fuentes comestibles primarias como aceite vegetal o grasas animales por ejemplo la manteca refinada. Los biocombustibles de segunda generación provienen de cultivos no comestibles como los biocombustibles celulósicos como desechos ricos en carbono, biomas vegetal celulósica y lignocelulósica como por ejemplo la manteca de cerdo residual. Las ventajas de ser un combustible de origen reciclado

requiere pocos recursos económicos y ayuda a reducir emisiones de combustibles fósiles (5).

La viabilidad de los biocombustibles de primera generación es debatible, ya que estas materias primas comestibles compiten con los cultivos alimentarios al requerir cierta cantidad de superficie terrestre, fertilizantes y suministro de agua. Esto conlleva a un alto costo de producción y utilizar de manera ineficiente los recursos para el cultivo de materias primas (6).

La manteca residual es la manteca generada a partir de la preparación de platillos elaborados con carne de cerdo, como el tocino, así como los restos de lo que se utilizó en la preparación de diversos platillos, en los cuales se empleó manteca refinada como baño de grasa para freír distintos alimentos.

La hidroquinona terc-butilo (TBHQ) es un aditivo alimentario comúnmente utilizado como un protector eficaz en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (7).

La hidroquinona terc-butilo (TBHQ) se ha utilizado para proteger contra la oxidación de aceites y alimentos oleaginosos a temperatura ambiente y en condiciones de fritura ya que posee una fuerte actividad antioxidante debido a la presencia de dos grupos hidroxilo fenólicos (8).

La hidroquinona terc-butilo está aprobada como antioxidante de grado alimenticio y es un conservante altamente eficaz para aceites vegetales insaturados, muchas grasas de animales comestibles y productos cárnicos debido que no causa decoloración y no altera el olor y el sabor del material al que se le añade (9).

Sin una disposición adecuada, la manteca residual se convierte en un problema ambiental cuando se desecha directamente en la basura doméstica o en el sistema de alcantarillado (10).

La industria agroalimentaria genera grandes cantidades de residuos que contribuyen a la contaminación ambiental. Los residuos de grasa animal constituyen algunos de los desechos más relevantes y su tratamiento resulta costoso debido a que las regulaciones ambientales son muy estrictas. Parte de estos costos se podrían reducir mediante la generación de bioenergía. El biodiesel representa una fuente de energía renovable, ya que es biodegradable, no tóxico, tiene buen perfil de emisiones y puede mezclarse hasta en un 20% con diésel fósil. Además de esto

hasta el 70% del costo de biodiesel depende del costo de la materia prima utilizada, el cual puede reducirse utilizando residuos de grasa animal (11).

El biodiesel tiene muchas ventajas y aspectos técnicos que permiten su mezcla en cualquier proporción con el diésel convencional lo que respalda las políticas de diversificación energética. Sin embargo, el biodiesel absorbe más humedad que el diésel debido a que los ésteres metílicos son compuestos higroscópicos y existe una cantidad limitada de información publicada sobre sus propiedades de afinidad con el agua. El contenido de agua puede afectar las características del combustible, reduciendo su calidad si se acumula agua libre, emulsificada o soluble (12).

Esta susceptibilidad del biodiesel está asociada a su composición química y varía considerablemente según la materia prima utilizada. El biodiesel se degrada por absorción de vapor de agua, autooxidación y ataque microbiano. El aumento de poblaciones de microorganismos ha demostrado tener la capacidad de degradar el tanque de almacenamiento de combustible y provocar corrosión. La contaminación del combustible acorta la vida del filtro y provocar problemas en el suministro de combustible, motor y daños en el equipo de inyección de combustible. Se confirma que la biodegradación de hidrocarburos es debido a la contaminación microbiana.

La actividad microbiana ocurre en la interfaz agua – FAME (ésteres metílicos de ácidos grasos), lo que da lugar a la formación visible de una biopelícula, la cual puede estar compuesta por bacterias, hongos y/o levaduras (13). En general, los antioxidantes fenólicos más comunes empleados para aumentar la estabilidad del biodiésel son la hidroquinona terc-butilo (TBHQ), el galato de propilo (PG), el pirogalol (PY), el hidroxitolueno butilado (BHT) y el hidroxí-anisol butilado (BHA). El TBHQ es más eficaz en biodiésel a base de aceites vegetales y poco eficaz en biodiésel producido a partir de materias primas con alto contenido de ácidos grasos libres (14).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la susceptibilidad comparativa al desarrollo microbiológico en FAME sintetizado a partir de manteca refinada y residual, simulando condiciones de almacenamiento en la cadena de suministro de combustible, así como identificar los microorganismos desarrollados en la interfaz FAME y FAME–agua.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos

En este estudio se utilizaron los siguientes reactivos: metanol al 99.9% (Chemika, Monterrey, México), NaOH con una pureza del 99.4% (Fagalab, Mocoquito, México), medio de cultivo Bushnell Haas en agar (Himedia, Thane, India), ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 50% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), y ácido tricloroacético al 2.5% (Lab Alley, Austin, TX, EE. UU.). El agua destilada fue obtenida de un proveedor local.

2.2 Materiales

La manteca residual se obtuvo como subproducto de la preparación doméstica de tocino y fue filtrada para separarla del residuo sólido restante utilizando papel filtro Grado 40 con retención de partículas de 8 μm , con el fin de eliminar posibles restos de alimentos. Posteriormente, se secó a 105 °C durante 20 minutos para evitar la presencia de humedad. La manteca refinada fue adquirida en un mercado local, y la etiqueta nutricional indicaba que se le añadieron antioxidantes y ácido cítrico para conservar el producto. Las muestras se almacenaron en un refrigerador de laboratorio en la oscuridad a 4 °C hasta su uso posterior.

2.3 Síntesis de FAME

El FAME sintetizado se preparó por duplicado siguiendo el método de transesterificación alcalina reportado por Parawira (15). La grasa se fundió, y la reacción se llevó a cabo por separado para la grasa de tocino y la grasa refinada en un vaso de precipitados de borosilicato de 600 mL. La síntesis consistió en una transesterificación básica en una sola etapa realizada a 65 °C, utilizando NaOH al 1.0% en peso como catalizador y una relación molar de metanol:grasa de 6:1, con una duración de reacción de 60 minutos.

2.4 Purificación de FAME

El proceso de purificación del FAME es necesario para garantizar la pureza requerida para su uso como combustible (16). La purificación comenzó con la

eliminación de la glicerina sedimentada, seguida de la remoción de otros residuos derivados de la reacción de transesterificación, como la glicerina no reaccionada y el metóxido, mediante lavados con agua desionizada (17). (Figura 2).

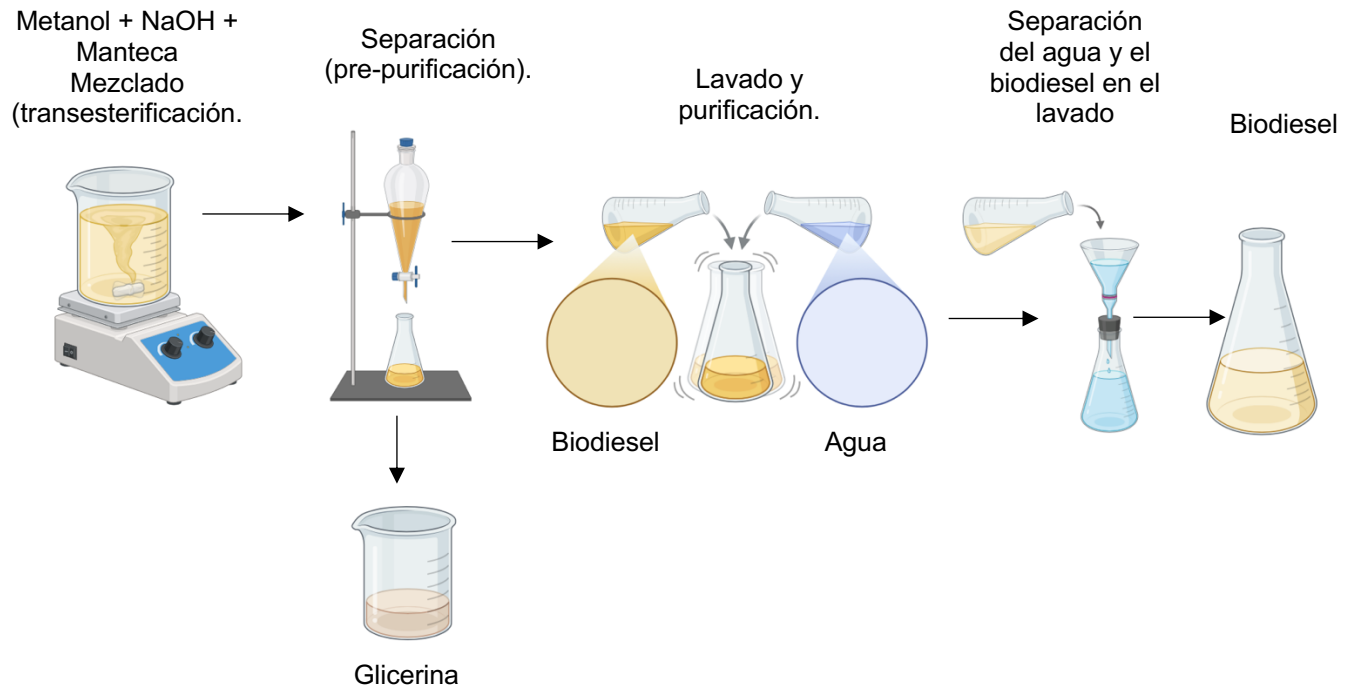


Fig. 2. Proceso de transesterificación alcalina y purificación de FAME.

El proceso de lavado de las muestras de FAME se realizó en un matraz de 1 litro equipado con un tapón de goma. Se combinaron volúmenes iguales de agua y FAME en el matraz, con agitación mecánica a 200 RPM durante 5 minutos para asegurar una adecuada interacción entre las fases. Posteriormente, la mezcla resultante de FAME y agua se transfirió a un embudo de separación de 1 litro y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras el periodo de reposo, la fase acuosa se drenó cuidadosamente, dejando únicamente la fase superior correspondiente al FAME purificado.

El proceso de lavado del FAME se repitió hasta que el agua utilizada en el proceso de purificación no mostró turbidez; este procedimiento requirió al menos cuatro

lavados. Finalmente, el agua residual del lavado fue eliminada del FAME mediante calentamiento a 105 °C, hasta que el FAME adquirió un color claro. Este cambio de color ocurre aproximadamente 15 minutos después de alcanzar la temperatura mencionada. El FAME obtenido cumplió con los parámetros de calidad establecidos en la norma ASTM D-6751, Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels (18).

2.5 Muestras y Aislamiento Microbiológico

Se analizaron por duplicado muestras de FAME refinado y residual para determinar su susceptibilidad al desarrollo microbiológico. Para ello, se mezclaron 25 mL de cada muestra de FAME con un volumen equivalente de agua potable y se dejaron descubiertas a 25 °C durante 14 días, simulando condiciones de almacenamiento de combustible. Durante todo el periodo de incubación, las muestras permanecieron en fases separadas. Esta configuración facilitó la visualización de regiones diferenciadas con contaminación microbiológica, funcionando como microecosistemas a escala de laboratorio para el FAME derivado de grasa refinada (Figura 3a) y manteca residual (Figura 3b).

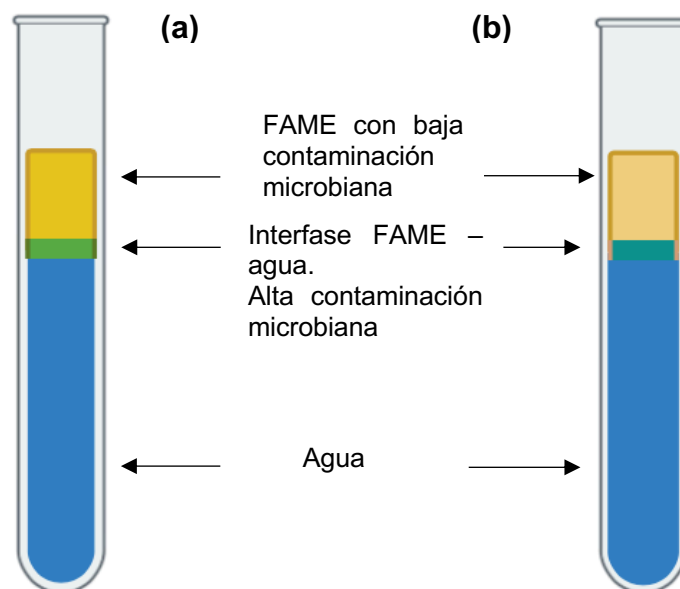


Fig. 3. Zona de contaminación microbiológica del FAME preparado a partir de (a) manteca refinada y (b) manteca residual.

La incorporación de volúmenes equivalentes de agua tiene como objetivo simular el efecto de la condensación de humedad dentro del contenedor de almacenamiento. Debido a la diferencia de densidad entre los dos líquidos, el agua se deposita en el fondo del biodiésel, replicando las condiciones observadas en sistemas de almacenamiento reales. Este enfoque experimental sirve como punto de partida para investigar zonas diferenciadas de contaminación microbiana, ya que el volumen de agua seleccionado permite una visualización más clara de la formación de biopelículas en la interfaz agua–FAME. Además, la simulación proporciona una plataforma reproducible para evaluar los riesgos de degradación microbiológica del biocombustible, especialmente ante la ausencia de regulaciones que establezcan el contenido máximo permitido de agua en sistemas industriales de almacenamiento de biodiésel.

Para evaluar el crecimiento de microorganismos en la fase FAME y en la interfaz FAME–agua de manteca refinada y residual, se preparó un medio de cultivo Bushnell Haas, recomendado para microorganismos presentes en combustibles y conforme a la norma ASTM E-1259, Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390 °C (19).

La preparación del medio de cultivo en cajas de Petri se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: se suspendieron 23.27 g del medio en 1000 mL de agua purificada o destilada. El medio de cultivo Bushnell Haas se calentó con agitación mecánica a 200 rpm para asegurar su disolución completa, y se esterilizó mediante autoclave a una presión de 15 lb/in² (121 °C) durante 15 minutos. Una vez enfriado a 45–50 °C, el medio se mezcló cuidadosamente y se vertió en cajas de Petri estériles. Para la inoculación, se utilizó 0.1 mL de cada muestra previamente homogeneizada, y la siembra se realizó directamente sobre el medio de cultivo. La dispersión de la muestra sobre la superficie del medio se realizó con una espátula de Drigalski, y el procedimiento se llevó a cabo por duplicado. Las cajas Petri se incubaron a 30.6 °C durante cuatro días utilizando una incubadora ECOSHEL Modelo 9052. La concentración microbiana expresada en unidades formadoras de

colonias por mililitro (UFC/mL), se calculó multiplicando el número de colonias contadaa en la dilución seleccionada por el factor decimal de dilución y el resultado dividido entre el volumen inoculado en (mL).

2.6 Ensayo de espectrometría de masas MALDI-TOF

La identificación de los microorganismos en las muestras de FAME se llevó a cabo utilizando la técnica de espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz con análisis de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS). Esta técnica permitió identificar microorganismos a partir de colonias desarrolladas en cajas Petri en un período corto de tiempo, mediante una metodología sencilla y automatizada, lo que redujo considerablemente los errores en el análisis (20).

Para la preparación de la muestra, se depositó directamente una pequeña cantidad de una colonia sobre la placa de acero pulido del espectrómetro de masas, formando una película delgada. Sobre esta película se aplicó 1 mL de la solución matriz (una solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en 50% de acetonitrilo y 2.5% de ácido tricloroacético), dejándose secar a temperatura ambiente. Las mediciones se realizaron utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF Autoflex III MS (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania), y el espectro se obtuvo automáticamente en el rango de 2–20 kD, operando en modo lineal positivo a una frecuencia de 200 Hz. Los parámetros establecidos para el espectrómetro fueron: IS1 a 20 kV, IS2 a 18.6 kV, lente a 6 kV y PIE a 40 ns. El espectro obtenido se comparó automáticamente mediante algoritmos integrados en el software del sistema con la base de datos MALDI Biotyper. El protocolo de trabajo del MALDI Biotyper permite una adquisición óptima de la muestra mediante la acumulación de 500 disparos láser en diferentes ubicaciones de la muestra. Los espectros fueron calibrados externamente utilizando una mezcla estándar de calibración para cubrir un rango de 4–17 kD.

Análisis de espectros (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania): Para la identificación de microorganismos, el espectro obtenido de los microorganismos objetivo fue procesado utilizando el software MALDI Biotyper 1.1. La lista de picos generada se comparó con la biblioteca de referencia del MALDI Biotyper 2.0

mediante un algoritmo de comparación integrado en el software. Una vez importado el espectro al programa, todo el proceso, desde el análisis hasta la identificación, se realizó automáticamente sin intervención del usuario (20).

3. Resultados

3.1 Síntesis y purificación de FAME

La síntesis de los FAMEs se realizó por separado mediante la transesterificación de manteca refinada (Figura 4a) y manteca residual (Figura 4b), utilizando metanol y NaOH como catalizador.

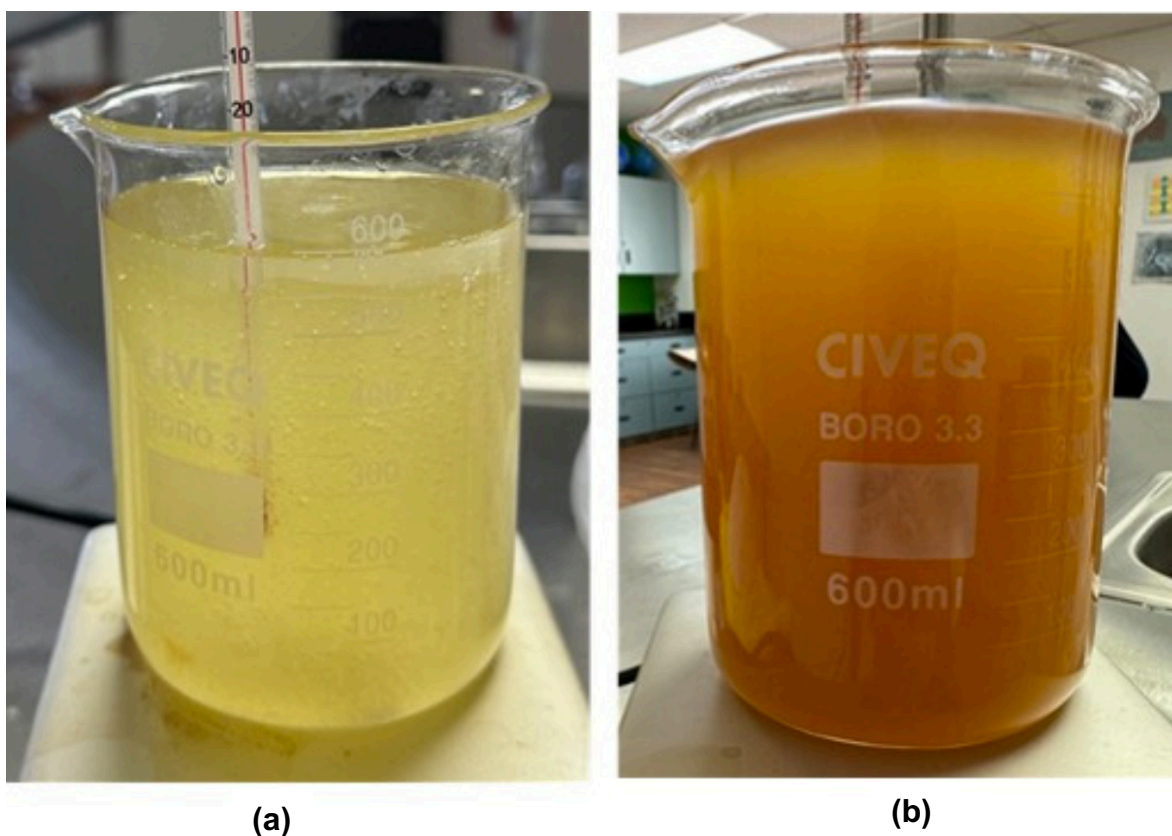


Fig.4. FAME preparado a partir de (a) manteca refinada y (b) manteca residual.

Durante la reacción de transesterificación, el alcohol interactúa con los triglicéridos, rompiendo los enlaces éster y formando una mezcla de ésteres metílicos, que

constituyen el biodiésel, mientras que la glicerina se genera como subproducto, como se muestra en la Figura 5.

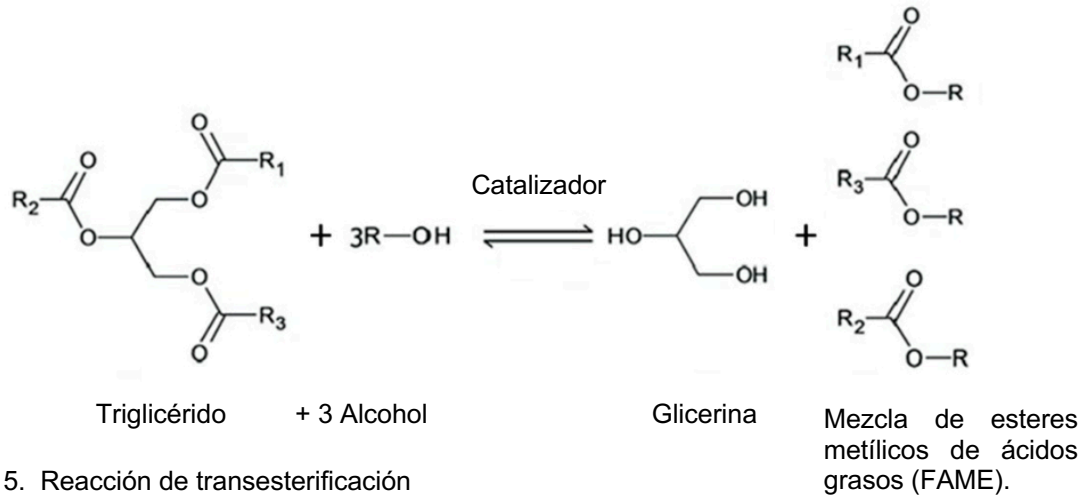


Fig. 5. Reacción de transesterificación

El color del FAME no es un parámetro regulado y puede presentar una amplia gama de variaciones tonales, que dependen principalmente de la calidad de la grasa o el aceite utilizado en su transformación. Sin embargo, un biodiésel de color claro indica que la materia prima no ha sido sometida a procesos de transformación por estrés térmico (21), como ocurre con la manteca refinada (Figura 4a), y su color puede variar desde amarillo pálido hasta ámbar claro. El color naranja oscuro de un FAME (Figura 4b) puede ser un indicador de degradación de la materia prima, así como de la presencia de impurezas que podrían sugerir la aparición microscópica de residuos orgánicos provenientes de la materia prima, los cuales fueron transferidos al FAME, como podría ser el caso del FAME producido a partir de manteca residual. Después de la reacción, los productos se enfriaron a temperatura ambiente y se dejaron reposar para permitir la separación de fases. La Figura 6 ilustra un embudo de separación que contiene los productos de la reacción: la capa superior, que representa el mayor volumen, corresponde al FAME; una delgada capa blanca en el medio representa el residuo formado como espuma; y la capa inferior, en una proporción moderada, consiste en glicerina.

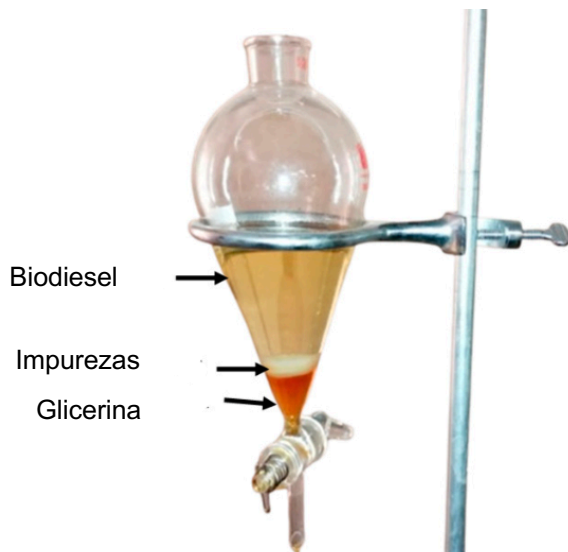


Fig.6. Separación de FAME y glicerina basado en diferencia de densidades en un embudo de separación.

Las dos capas inferiores, productos de la reacción, fueron extraídas mediante drenaje utilizando un embudo de separación, y posteriormente se realizó la purificación del FAME para eliminar las impurezas residuales. Según la norma ASTM D6751 (18), que establece los parámetros fisicoquímicos de los FAME, no se prescribe un procedimiento específico de purificación. Sin embargo, el lavado con agua es ampliamente reconocido como el método más eficaz y económico comúnmente empleado para eliminar las impurezas residuales de los FAME.

3.2 Perfiles microbianos de las muestras recolectadas

Después de la incubación a 30.6 °C durante cuatro días, en cajas Petri sembradas con una muestra de la biopelícula desarrollada en la interfaz entre el FAME de manteca residual y agua, se desarrolló una colonia de microorganismos, como se observa en la Figura 7a, y no fue posible cuantificar las UFC debido a la superposición de colonias. En la Figura 7c, dado el volumen de muestra inoculada de 0.1 mL en la caja de Petri, el cálculo estima la presencia de 10 UFC/mL de microorganismos, originados en la fase FAME de la manteca residual. Esto no se observó en el FAME de manteca refinada (Figuras 7b y 7d).

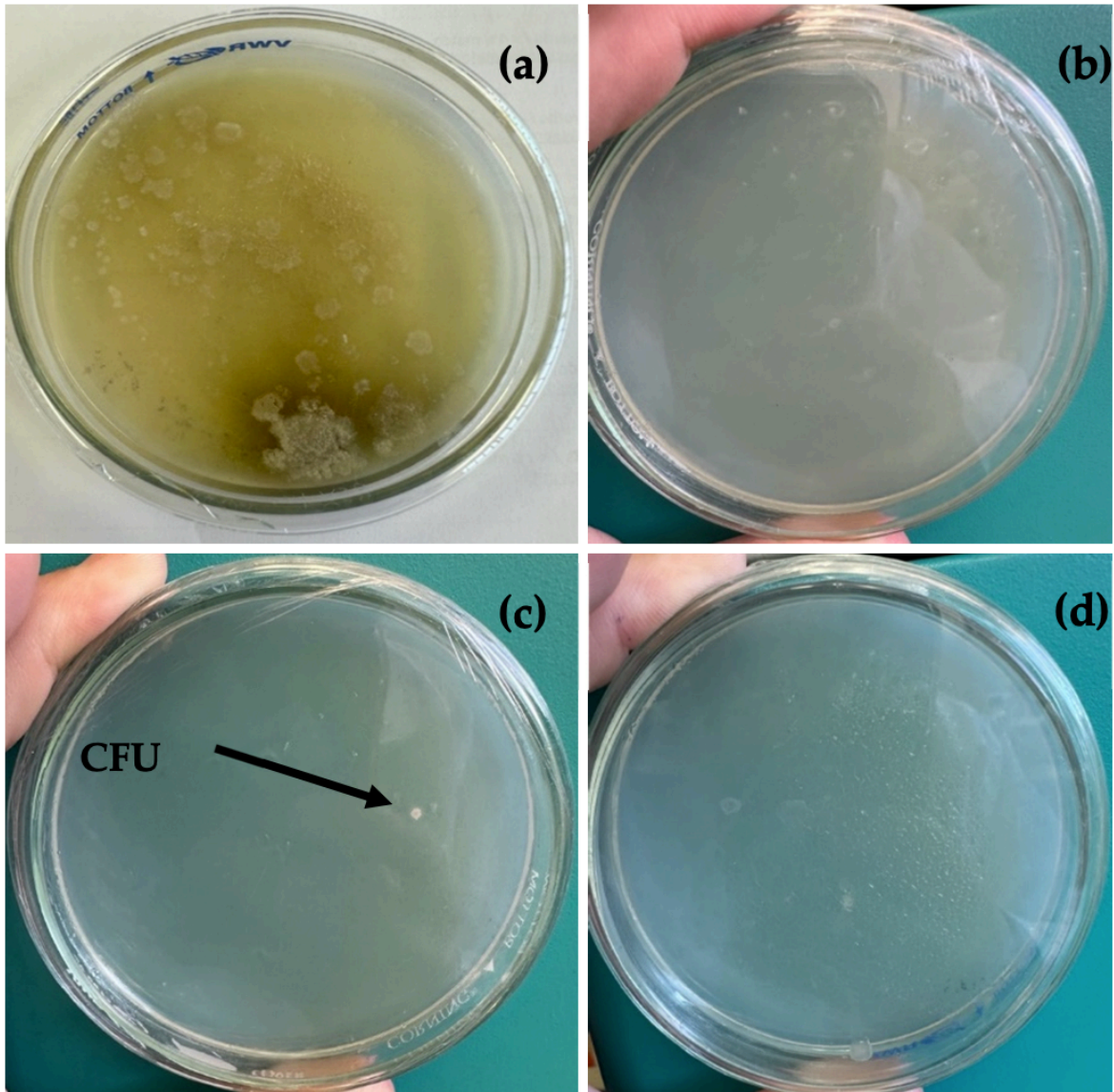


Fig. 7. Placas sembradas en medio Bushnell Haas con: (a) FAME de manteca residual + agua; (b) FAME de manteca refinada + agua; (c) FAME de manteca residual; y (d) FAME de manteca refinada.

Las Figuras 7b y 7d muestran que el FAME sintetizado a partir de manteca refinada no presentó crecimiento microbiológico, probablemente debido a la pérdida de nutrientes durante el proceso de refinación industrial. Además, la presencia de antioxidantes, TBHQ y conservantes sintéticos utilizados para prolongar su vida útil inhibe el desarrollo microbiológico (22).

El FAME sintetizado a partir de manteca residual fue el más susceptible al ataque microbiológico, probablemente debido a la presencia de nutrientes como triglicéridos, ácidos grasos y componentes menores, incluyendo colesterol, fosfolípidos, vitaminas, aldehídos, cetonas y pigmentos que permanecieron en la fracción lipídica (23), (24).

Dado que no se implementan procesos de purificación directa para eliminar estos compuestos en la manteca de cerdo residual, como el blanqueo, desgomado, desodorización y neutralización (25), dichos compuestos se transfieren directamente al FAME producido a partir de esta fuente.

3.3 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF MS

Antes del análisis, se realizó una inspección visual detallada de las colonias presentes en la placa correspondiente a la muestra "FAME de manteca residual + agua" (Figura 7a). Se seleccionó una colonia bien definida, aislada y con morfología consistente para el análisis posterior por espectrometría de masas. El espectro obtenido se comparó automáticamente mediante algoritmos integrados en el software del sistema con la base de datos MALDI Biotyper. El espectro de masas obtenido se procesó con el programa MALDI Biotyper 1.1. La lista de picos generada se comparó con la biblioteca de referencia del MALDI Biotyper 2.0 aplicando un algoritmo de comparación integrado en el software. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 8.

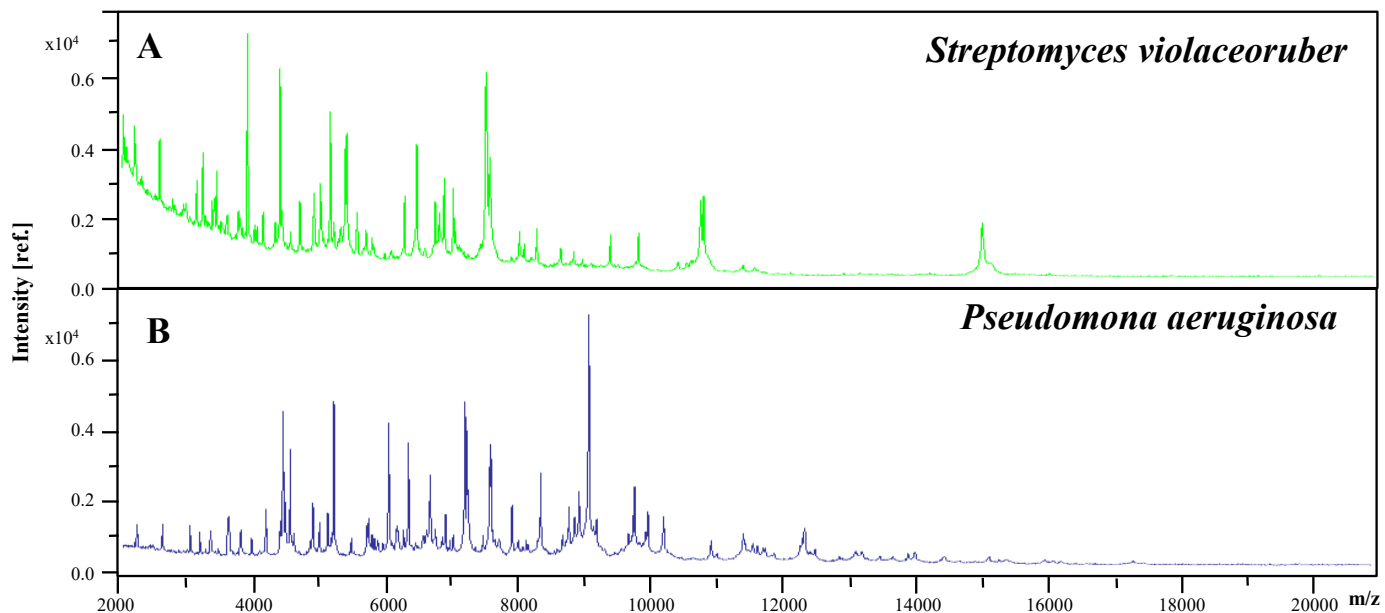


Fig. 8. Espectro de perfil de espectrometría de masas con datos recopilados de la base de datos Biotyper 2.0: (A) *Streptomyces violaceoruber*; (B) *Pseudomonas aeruginosa*.

En el perfil espectral de masas, se puede observar la relación bidimensional entre la masa/carga (m/z) que presenta, con respecto a la intensidad del pico correspondiente a un microorganismo determinado.

4. Discusión

La duración y las condiciones de la simulación de almacenamiento fueron cuidadosamente seleccionadas. La decisión de realizar un experimento de 14 días a temperatura constante se basó en establecer un punto de referencia controlado que permitiera evaluar la contaminación microbiana en FAME sin interferencias de variaciones ambientales. Este enfoque inicial nos permitió identificar tendencias microbiológicas y determinar diferencias en la susceptibilidad entre FAMEs derivados de residuos y un FAME de manteca refinada bajo condiciones estables. Reconocemos que el almacenamiento práctico del biodiésel suele estar sujeto a fluctuaciones de temperatura, humedad variable, contenido de agua y períodos de almacenamiento prolongados. Sin embargo, la contaminación microbiana puede desarrollarse relativamente rápido cuando las condiciones favorecen el crecimiento bacteriano.

La característica higroscópica de los FAMEs provoca una rápida absorción de agua en situaciones de alta humedad (26). En consecuencia, el contacto con la humedad ambiental puede superar el contenido máximo permitido de agua en los FAMEs, que es de 500 ppm, según lo establecido por la norma ASTM D 2709 “Standard Test Method for Water and Sediment in Middle Distillate Fuels by Centrifuge” (27). Esto puede provocar efectos negativos significativos en las propiedades fisicoquímicas, particularmente en el desarrollo de microorganismos, como el crecimiento reportado de microorganismos tales como *Cladosporium*, *Comamonas*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Tolomonas*, *Candida*, *Aspergillus* y *Fusarium* (28), (29). El perfil presentado en la Figura 8 corresponde a dos tipos de microorganismos. La Figura 8A muestra *Streptomyces violaceoruber*, el cual se desarrolló en ambas muestras: el FAME preparado con manteca residual + agua (Figura 7a), y el FAME elaborado únicamente con manteca residual (Figura 7c).

Este microorganismo es una bacteria Gram positiva que se encuentra de forma natural en el suelo (30), y se ha asociado con infecciones como el micetoma. También se ha informado que especies del género *Streptomyces* pueden causar septicemia y afecciones pulmonares (31). El perfil espectral de masas mostrado en la Figura 8B, identificado exclusivamente en el FAME derivado de manteca residual + agua, corresponde a *Pseudomonas aeruginosa*, un bacilo Gram negativo del género *Pseudomonas*. Estas bacterias están comúnmente presentes en el suelo, aguas dulces y ambientes marinos. *Pseudomonas aeruginosa* ha recibido especial atención debido a su patogenicidad oportunista y su capacidad para causar enfermedades en humanos (32).

El agua utilizada para simular la contaminación en condiciones de almacenamiento de FAME probablemente estaba contaminada con microorganismos, los cuales fueron posteriormente transferidos al FAME, lo que sugiere que la introducción de microorganismos se debe principalmente a su presencia en el agua. Aunque la presencia de agua en el biodiésel no es un parámetro deseado, esta se introduce con frecuencia a través de la humedad ambiental y migra a lo largo de las paredes del recipiente, transportando microorganismos. Una vez inoculados en el FAME mediante la fase acuosa, estos microorganismos utilizan los nutrientes disponibles

en el biodiésel, como los compuestos ricos en carbono, para sustentar su crecimiento y proliferación. Esta interacción resalta la importancia de controlar la presencia de agua en el FAME durante su almacenamiento y manipulación, con el fin de mitigar la contaminación microbiana y sus efectos adversos sobre la estabilidad fisicoquímica del FAME.

La Tabla 1 muestra los reportes de la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en FAMEs. En cuanto a la presencia de *Streptomyces violaceoruber* identificada en el FAME derivado de grasa residual, este estudio contribuye a ampliar el conocimiento actual sobre la diversidad microbiana asociada a este biocombustible.

Tabla 1. Desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* en FAME según lo reportado en la literatura científica.

Microorganismo	Materia prima del FAME	Interacción del microorganismos con el FAME	Ref.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aceite vegetal residual	El impacto de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en los FAME está principalmente relacionado con su capacidad para causar biodeterioro. Estas bacterias pueden contribuir a la formación de biopelículas y a la degradación de los componentes del FAME, lo que puede resultar en una disminución de la calidad del combustible y en problemas operativos, como la obstrucción de filtros.	(33) (34)
	90% soya, 10% manteca de res	El impacto de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en los FAME está principalmente relacionado con la capacidad para degradar los compuestos presentes en este tipo de combustible. Esta bacteria puede contribuir a la biodegradación del FAME, afectando su calidad y estabilidad durante el almacenamiento.	(35)
	80% soya, 20 manteca de res	<i>Pseudomonas</i> es uno de los principales contaminantes responsables del deterioro de combustibles junto con <i>Comamonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Tolomonas</i> , <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> .	(26)
	Aceite de palma	El aceite de palma y los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) están sujetos a biodegradación aeróbica por bacterias como <i>Pseudomonas</i> , comúnmente presentes en ambientes naturales abiertos.	(36)
	<i>J.curcas</i> <i>A. aculeata</i>	Los FAMEs (ésteres metílicos de ácidos grasos) mostraron un deterioro notable causado por <i>Pseudomonas</i> durante condiciones simuladas de almacenamiento, principalmente debido a la contaminación microbiana. Se observaron cambios significativos en el pH, la tensión superficial y el contenido de ésteres incluso en un corto período de 30 días, y la inoculación con hongos aceleró el proceso de degradación, provocando una reducción de hasta el 12% en la concentración de ésteres.	(37)
	Aceite de soya (B20)	La adición de FAMEs provoca un aumento en el número de microorganismos, lo que resulta en la degradación de la fracción correspondiente a los FAMEs.	(38)

Streptomyces violaceoruber

En el presente trabajo, este microorganismo fue identificado en los FAMES de manteca residual, lo cual no había sido reportado previamente por la literatura científica. Sin embargo, este microorganismo se encuentra comúnmente en diversos lugares como el suelo (39), la industria (40) y el agua (41).

La ruta de biodegradación de las moléculas de FAME es un proceso de múltiples etapas que es similar tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Primero los FAMES se desesterifican primero para formar ácidos grasos libres y metanol. Luego, los ácidos grasos libres sufren la eliminación secuencial de componentes de dos carbonos mediante un proceso conocido como β -oxidación. El metanol liberado se biodegrada fácilmente en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. El metabolismo de los ésteres de glicerina comienza con la desesterificación para formar ácidos grasos libres y glicerina, mediante enzimas estererasas conocidas como lipasas, que se han encontrado en microorganismos como los consorcios de *Pseudomonas* (42). El estudio confirma que la introducción de FAMES afecta los tipos y la actividad de los microorganismos presentes en el microcosmos del combustible. Es menos probable que los microorganismos se desarrollen directamente en los FAMES; en cambio, necesitan agua y nutrientes para desarrollarse como biopelícula en la interfaz agua-FAME. Aunque la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en biodiésel derivado de diversas fuentes de materia prima ya había sido reportada previamente, no existían casos documentados de esta bacteria en biodiésel sintetizado a partir de manteca residual. De manera similar, la identificación de *Streptomyces violaceoruber* en el presente estudio es particularmente relevante, ya que podría respaldar futuras propuestas de estrategias de mitigación o su posible uso como microorganismo para la biorremediación de suelos contaminados con biodiésel.

Según estudios realizados por Soriano et al. (43) y Schleicher et al. (44), en sistemas donde ocurre crecimiento microbiano, existe una tendencia al aumento del índice de acidez, fenómeno particularmente notable en el biodiésel B100. Este incremento se atribuye a la actividad microbiana, que genera ácidos orgánicos responsables de la disminución de los niveles de pH. Aunque no existe una normativa que defina los parámetros máximos permitidos para la presencia de microorganismos en biodiésel

almacenado, se recomienda ampliamente la adición de sustancias activas biocidas de amplio espectro, como 3,3-Metilenbis (5-metiloxazolidina) (MBO) y 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona + 2-Metilisotiazol-3(2H)-ona (MIT/CMIT). Este enfoque ayuda a mitigar el crecimiento microbiano en el biodiésel almacenado, asegurando su estabilidad y calidad a lo largo del tiempo (45).

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación destacan la importancia de la calidad de la materia prima y el efecto de la presencia de agua durante el almacenamiento de los FAMEs producidos a partir de manteca, como parámetros que pueden tener gran relevancia al influir en la contaminación microbiana, subrayando el potencial de los FAMEs como una alternativa sostenible a los biocombustibles convencionales.

Aunque no hay evidencia de contaminación microbiológica en los FAMEs derivados de manteca, existen informes de contaminación en otras fuentes de ácidos grasos. La manteca residual proveniente de la preparación de alimentos podría utilizarse para convertir estos desechos en FAMEs, representando una solución alternativa para prevenir la contaminación por disposición inadecuada de residuos, al mismo tiempo que ofrece la oportunidad de generar un biocombustible con valor agregado, alineado con los objetivos globales de sostenibilidad ambiental y seguridad energética. Sin embargo, es crucial que el FAME no entre en contacto con agua durante los procesos de síntesis y almacenamiento y, como medida preventiva, se debe incorporar un agente antimicrobiano para garantizar su calidad y seguridad. La investigación concluye que la manteca residual es más propensa al ataque microbiológico que la manteca refinada, especialmente cuando las condiciones de agua y temperatura favorecen el crecimiento microbiano. Este proceso conduce a un aumento en el índice de acidez, lo cual puede afectar negativamente a los metales al inducir corrosión. Se recomiendan métodos de control para prevenir la contaminación microbiológica en los FAMEs, como la adición de MBO, MIT/CMIT o un biocida de amplio espectro.

En futuras investigaciones, ampliar el diseño experimental para incorporar variaciones climáticas y monitoreo a largo plazo proporcionaría una representación más precisa de las condiciones reales de almacenamiento industrial. Además, correlacionar directamente el crecimiento microbiano con la degradación de la calidad del combustible e implementar métodos cuantitativos como el recuento en placa, la luminiscencia de ATP y la qPCR permitirá una evaluación más sólida de la carga microbiana en los FAMES y en la interfaz a lo largo del tiempo, mejorando la valoración de la gravedad de la contaminación.

6. Referencias

1. *Biodiesel production from Jatropha curcas: a review*. **Parawira, Wilson**. s.l. : Scientific Research and Essays , 2010, Vol. 5.
2. *Synthesis of biodiesel via acid catalysis* . **Edgar Lotero, Yijun Liu, Dora E. Lopez, Kaewta Suwannakarn, David A. Bruce, James G. Goodwin, Jr.** s.l. : Industrial & Engineering Chemistry Research, 2005.
3. *Biodiesel production from waste cooking oil: A perspective on catalytic processes*. **Montserrat Cerón Ferrusca, Rubi Romero, Sandra Luz Martínez, Armando Ramírez-Serrano, Reyna Natividad**. s.l. : processes, 2023.
4. *Synthesis of biodiesel from second-used cooking oil*. **Wanodya Asri Kawentar, Arief Budiman**. s.l. : Energy Procedia, 2013.
5. **Neha Srivastava, Rahul Kumar Kharwar, P.K. Mishra**. *Cost economy analysis of biomass-based biofuel production*. s.l. : From Cellulose to Cellulase: Strategies to Improve Biofuel Production, 2019.
6. *Sustainability of the four generations of biofuels – A review*. **Nurul Syahirah Mat Aron, Kuan Shiong Khoo, Kit Wayne Chew, Pau Loke Show, Wei-Hsin Chen, The Hong Phong Nguyen**. s.l. : International Journal of Energy Research, 2020.
7. *Alarming impact of the excessive use of tert-butylhydroquinone in food products: A narrative review*. **Arezou Khezerlou, Amir pouya Akhlaghi, Adel Mirza Alizadeh, Parvin Dehghan, Parham Maleki**. s.l. : Toxicology Reports , 2022.
8. *Transformation of TBHQ in lard and soybean oils during room temperature storage* . **Xiaolan Xu, Yanlan Bi, Hongyan Wang, Jun Li, Ziyang Xu**. s.l. : European Journal of Science and Technology , 2019.
9. *Multispectroscopic studies on the interaction of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ), a food additive, with bovine serum albumin*. **Nahid Shahabadi, Maryam Maghsudi, Zahra Kiani, Mehdi Pourfoulad**. s.l. : Food Chemistry, 2010.

10. *Reducing Fat, Oil, and Grease (FOG) deposits formation and adhesion on sewer collection system structures through the use of fly ash replaced cement-based materials.* **Samrin A. Kusum, Mohammad Pour-Ghaz, Joel J. Ducoste.** s.l. : Water Research, 2020.
11. *Trends in biodiesel production from animal fat waste.* **Fidel Toldrá-Reig, Leticia Mora, Fidel Toldrá.** s.l. : applied sciences , 2020.
12. *Assessing water affinity properties of biodiesel, diesel fuel, and blends by measuring water saturation and water absorption.* **Nurmajid Abdurrojaq, Lukman Nulhakim, Rizal Zaelani, Kemal Ginanjar, Riesta Anggarani, Lies Aisyah, Nur Allif Fathurrahman, Cahyo Setyo Wibowo.** s.l. : International Conference on Biomass and Bioenergy, 2022.
13. *Microbial contamination of diesel-biodiesel blends in storage tank; an analysis of colony morphology.* **Leily Nurul Komariah, Susila Arita, Muhammad Rendana, Cindi Ramayanti, Ni Luh Suriani, Desi Erisna.** s.l. : Heliyon, 2022.
14. *Biodiesel antioxidants and their impact on the behavior of diesel engines: A comprehensive review.* **Homa Hosseinzadeh-Bandbafha, Dipesh Kumar, Bhaskar Singh, Hossein Shahbeiga, Su Shiung Lam, Mortaza Aghbashlo, Meisam Tabatabaei.** s.l. : Fuel Processing Technology, 2022.
15. *Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review.* **Parawira, Wilson.** s.l. : Scientific Research and Essays , 2010.
16. *Recent development of advanced processing technologies for biodiesel production: A critical review.* **Muhammad Aamir Bashir, Sarah Wu, Jun Zhu, Anilkumar Krosuri, Muhammad Usman Khan, Robinson Junior Ndeddy Aka.** s.l. : Fuel Processing Technology, 2022.
17. *Dry washing biodiesel purification using fumed silica sorbent.* **Mónica Catarino, Eduardo Ferreira, Ana Paula Soares Dias, João Gomes.** s.l. : Chemical Engineering Journal, 2020.
18. **ASTM International.** Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. *ASTM E1259.*
19. **ASTM .** Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390 °C. s.l. : ASTM International .
20. *Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories.* **Laura Ferreira, Silvia Vega, Fernando Sánchez-Juanes, Magdalena González, Ana Herrero, Ma Carmen Muñiz, José Manuel González-Buitrago, Juan Luis Muñoz.** s.l. : Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2010.
21. **Wang Y, Ma C, Liu C, Lu X, Feng X, Ji X.** Thermodynamic study of choline chloride-based deep eutectic solvents with water and methanol. [aut. libro] Barat Ghobadian, Masoud Dehghani-Soufi, Akbar Heydari Manizheh Khanian-Najaf-

Abadi. *Determination of biodiesel yield and color after purification process using deep eutectic solvent (choline chloride:ethylene glycol)*. 2022.

22. **World Health Organization**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Codex Alimentarius; Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 2024.

23. *Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production*. **Ivana B. Banković-Ilić, Ivan J. Stojković, Olivera S. Stamenković, Vlada B. Veljkovic, Yung-Tse Hung**. s.l. : Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014.

24. **Felix Uchenna Samuel, Jacob Oluwoye**. Production of Biofuel from Pork Fat. [aut. libro] Benito Soto-Blanco Tanmoy Rana. *Good practices and principles in pig farming* . 2024.

25. **I. Bhattacharya, S. Yan, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, Tian C. Zhang**. Animal Fat Biodiesel . [aut. libro] Rao Y. Surampalli, Tian C. Zhang, Song Yan, Xiaolei Zhang R.D. Tyagi. *Biodiesel Production: Technologies, Challenges, and Future Prospects*. s.l. : ASCE Library , 2022.

26. *Removal of water content from biodiesel and diesel fuel using hydrogel adsorbents* . **P. B. L. Fregolente, M. R. Wolf Maciel, L. S. Oliveira**. s.l. : Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2015.

27. **ASTM** . ASTM D2709-22. *Standard Test Method for Water and Sediment in Middle Distillate Fuels by Centrifuge*. s.l. : ASTM International .

28. *Microorganisms in Diesel and in Biodiesel Fuels*. **Golob, Botjan Klofutar. Janvit**. s.l. : Acta Chimica Slovenica, 2007.

29. *Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide*. **Francielle Bucker, Cristiane Santos Barbosa, Patrícia Dörr Quadros, Mariana Krüger Bueno, Paula Fiori, Chun te Huang, Ana Paula Guedes Frazzon, Marco Flores Ferrão, Flávio Anastácio de Oliveira Camargo, Fátima Menezes Bento**. s.l. : International Biodeterioration & Biodegradation, 2014.

30. *Safety evaluation of collagenase from Streptomyces violaceoruber*. **Koichi Harazono, Yuta Atsumi, Naoki Shirasaka**. s.l. : Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2020.

31. *Streptomyces Pneumonia in a Patient with Human Immunodeficiency Virus Infection: Case Report and Review of the Literature on Invasive Streptomyces Infections* . **Eileen F. Dunne, William J. Burman, Michael L. Wilson**. s.l. : Clinical Infectious Diseases , 1998.

32. *The pyocins of Pseudomonas aeruginosa*. **Yvon Michel-Briand, Christine Baysse**. s.l. : Biochimie, 2002.

33. *Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 – a review*. **Passman, F.J.** s.l. : International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, Vol. 81.

34. *Biodegradability and microbial community investigation for soil contaminated with diesel blending with biodiesel.* **Yun-An Chen, Pao-Wen Grace Liu, Liang-Ming Whang, Yi-Ju Wu, Sheng-Shung Cheng.** s.l. : Process Safety and Environmental Protection, 2019, Vol. 130.
35. *Evaluation of the deteriogenic microbial community using qPCR, n-alkanes and FAMEs biodegradation in diesel, biodiesel and blends (B5, B10, and B50) during storage.* **Francielle Bucker a, Tiane Martin de Moura a , Michele Espinosa da Cunha, Patricia Dörr de Quadros, Sabrina Anderson Beker, Juciana Clarice Cazarolli, Elina Bastos Caramão, Ana Paula Guedes Frazzon, Fátima Menezes Bento.** s.l. : Fuel , 2018, Vol. 233.
36. *Microbial degradation of palm (Elaeis guineensis) biodiesel.* **Mata-Segreda, Giselle Lutz Max Chavarría María Laura Arias Julio F.** s.l. : Revista de Biología Tropical, 2006, Vol. 54.
37. *Microbial growth in Acrocomia aculeata pulp oil, Jatropha curcas oil, and their respective biodiesels under simulated storage conditions.* **Juciana Clarice Cazarolli, Patricia Dörr de Quadros, Francielle Bucker, Mariana Ruiz Frazão Santiago, Clarisse Maria Sartori Piatnicki, Maria do Carmo Ruaro Peralba, Eduardo Homem de Siqueira Cavalcanti, Fátima Menezes Bento.** s.l. : Biofiel Research Journal, 2016.
38. *Microbial sludge formation in Brazilian marine diesel oil (B0) and soybean methyllic biodiesel blends (B10 and B20) during simulated storage.* **Thais Livramento Silva, Juciana Clarice Cazarolli, Tania Mara Pizzolato, Ana Paula Guedes Frazzon, Michele Bertoni Mann, Jeverson Frazzon, Danielle Kochenborger John, Marco Flôres Ferrão, Pabulo Henrique Rampelotto, Emmanuel Bezerra D'Alessandro.** s.l. : Fuel , 2022, Vol. 308.
39. *Dissolution of clotted blood from slaughtered cattle by alkaline protease produced by Streptomyces violaceoruber isolated from saline soil in Saudi Arabia.* **Al-Dhabaan, Fahad A.** s.l. : Journal of King Saud University - Science , 2024.
40. *Statistical optimization of alkaline xylanase production from Streptomyces violaceoruber under submerged fermentation using response surface methodology.* **S. Khurana, M. Kapoor, S. Gupta, R. C. Kuhad.** s.l. : Indian Journal of Microbiology, 2007.
41. *Ammonia Released by Streptomyces aburaviensis Induces Droplet Formation in Streptomyces violaceoruber.* **Kathrin Schmidt, Dieter Spiteller.** s.l. : Journal of Chemical Ecology, 2017.
42. *Natural attenuation of fatty acid methyl esters (FAME) in soil and groundwater.* **Alan O. Thomas, Maureen C. Leahy, Jonathan W. N. Smith, Mike J. Spence.** s.l. : Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology, 207.
43. *Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration.* **Adriana Ururahy Soriano, Luiz Fernando Martins, Eliane Santos de Assumpção Ventura, Frederico Henrique Teixeira Gerken de Landa, Érika de**

Araújo Valoni, Fátima Regina Dutra Faria, Rafael Fragoso Ferreira, Maria Clara Kremer Faller, Renato Rocha Valério. s.l. : International Biodeterioration & Biodegradation, 205, Vol. 99.

44. *Microbiological stability of biodiesel–diesel-mixtures.* **T. Schleicher, R. Werkmeister, W. Russ, R. Meyer-Pittroff.** s.l. : Bioresource Technology, 2009, Vol. 100.

45. *Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60 days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10).* **A. Zimmer, J. Cazarolli, R.M. Teixeira, S.L.C. Viscardi, E.S.H. Cavalcanti, A.E. Gerbase d , M.F. Ferrão, C.M.S. Piatnicki, F.M. Bento.** s.l. : Fuel, 2013, Vol. 112.

7. Anexos

7.1 Otros productos académicos

7.1.1 Artículo como primer autor, titulado “Extraction Methods and Applications of Bioactive Compounds from Neem (*Azadirachta indica*): A Mini-Review” publicado en la revista Mini Reviews in Organic Chemistry. DOI: 10.2174/1570193X19666220707125726

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Mini-Reviews in Organic Chemistry, XXXX, XX, 1-11

1

MINI-REVIEW ARTICLE

Extraction Methods and Applications of Bioactive Compounds from Neem (*Azadirachta indica*): A Mini-Review

Samuel Lepe de Alba¹, Conrado García-González^{1,*}, Marcos A. Coronado Ortega¹, José R. Ayala Bautista¹, Gisela Montero Alpírez¹, and Daniela G.L. Montes Núñez¹

¹Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, México

ARTICLE HISTORY

Received: April 12, 2022
Revised: April 29, 2022
Accepted: May 18, 2022

DOI:
10.2174/1570193X19666220707125726

Abstract: Neem tree (*Azadirachta indica*), native to the Indian subcontinent, is known as a versatile plant, a rich source of bioactive compounds such as azadirachtin, nimonol, nimocinol, nimocinolide, gallic acid, gallo catechin, epicatechin, azadiradione, nimbin, salannin, epoxyazadiradione, etc. The isolated phytochemicals from neem, among others, are more than 300. The present work details the techniques for extracting compounds from different parts of neem, such as bark, husk seed, seed, seed oil, tree, leaves, and flowers. Furthermore, it comments on the various applications, including medicinal, environmental, and veterinary, of the neem-derived bioactive compounds, as well as their use in cattle raising and in cosmetics, disinfectants, rubber, and textile production, on the basis of a systematic documentary analysis from 2019 onwards.

Keywords: Neem, *Azadirachta indica*, extracts, applications of neem, azadirachtin, nimbin.

1. INTRODUCTION

Neem (*Azadirachta indica*) is a tree in the mahogany family Meliaceae, typically grown in the Indian subcontinent. The “good health” properties of the parts of neem and of the neem-derived extracts have been described in the ancient Sanskrit as far back as 4,000 years ago. Neem is known as the “village pharmacy” due to its large application in traditional medicine practices to prevent and treat various diseases [1, 2]. Medicinal plant products have a long history of use in India, China, and other regions of the world, although scientific research which validates their use has not been carried out in all cases [3]. In spite of this, the essential oil and plant extracts from neem can be considered as a sustainable alternative to a number of currently used synthetic products. The neem-derived bioactive compounds are complex mixtures of secondary metabolites [4, 5]. They cover a wide spectrum of pharmacological effects showing a diversity of biological properties, as anti-inflammatory [6], antioxidant [7] and anticancer [8]. Antimicrobial activity has been proven against a wide range of microorganism such as bacteria (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) [9], fungi (*Sclerotium rolfsii*, *Pleurotus ostreatus*) [10], viruses (*dengue virus*, *yellow fever virus*) [11], protozoa (*Leishmania sp.*, *Trichomonas vaginalis*) [12], insects (*Anthrenus verbasci*) [13], and plants [5].

The present work summarizes the techniques for extracting bioactive compounds from different parts of neem, such

as bark, husk seed, seed, seeds oil, tree, leaves, and flowers. Furthermore, it comments on the various applications, including medicinal, environmental, and veterinary, of the neem-derived bioactive compounds, as well as their use in cattle raising and in cosmetics, disinfectants, rubber, and textile production, on the basis of a systematic documentary analysis covering the period of 2019 to 2022.

2. PHYTOCHEMICAL ASPECTS

2.1. Taxonomy of *Azadirachta indica*

Neem has the scientific name *Azadirachta Indica* and belongs to the family of Meliaceae which also belongs the cedar, the mahogany and the paradise. The neem classification is described as follows in Table 1 [6].

Table 1. Taxonomy of neem.

Kingdom	Plantae
Sub-kingdom	Tracheophyta
Division	Embryophytes
Sub-division	Angiosperms
Class	Dicotyledonous
Order	Geraniales
Family	Meliaceae
Genus	<i>Azadirachta</i>
Species	<i>Azadirachta indica</i>

*Address correspondence to this author at the Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, México;
E-mail: cnrdgarcia@uabc.edu.mx

7.1.2 Artículo como primer autor, titulado “Comparison of Susceptibility to Microbiological Contamination in FAMES Synthesized from Residual and Refined Lard During Simulated Storage” publicado en la revista *applied biosciences*. DOI doi.org/10.3390/applbiosci4030039



applied biosciences



Article

Comparison of Susceptibility to Microbiological Contamination in FAMES Synthesized from Residual and Refined Lard During Simulated Storage

Samuel Lepe-de-Alba^{1,†}, Conrado Garcia-Gonzalez^{1,*†}, Fernando A. Solis-Dominguez^{2,*}, Rafael Martínez-Miranda³, Mónica Carrillo-Beltrán¹, José L. Arcos-Vega¹, Carlos A. Sagaste-Bernal², Armando Pérez-Sánchez⁴, Marcos A. Coronado-Ortega¹ and José R. Ayala-Bautista¹

¹ Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez, Insurgentes Este, Mexicali 21280, Mexico; samuel.lepe@uabc.edu.mx (S.L.-d.-A.); monica@uabc.edu.mx (M.C.-B.); arcos@uabc.edu.mx (J.L.A.-V.); coronado.marcos@uabc.edu.mx (M.A.C.-O.); ramon.ayala91@uabc.edu.mx (J.R.A.-B.)

² Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez, Insurgentes Este, Mexicali 21280, Mexico; carlos.sagaste@uabc.edu.mx

³ Departamento de Microbiología, Clínica Hospital Almatér, Mexicali 21100, Mexico; dr.raffm@gmail.com

⁴ Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd Universitario 1000 Valle de Las Palmas, Tijuana 22260, Mexico; armando.perez.sanchez@uabc.edu.mx

* Correspondence: cnrdgarcia@uabc.edu.mx (C.G.-G.); solisf@uabc.edu.mx (F.A.S.-D.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract

The present research features an experimental comparative design and the objective of this work was to determine the susceptibility to microbiological contamination in fatty acid methyl esters (FAMES) and the FAME–water interface of residual and refined lard, large volume simulating storage conditions as fuel supply chain, and to identify the microorganisms developed. The plates were seeded according to ASTM E-1259 and the instructions provided by the manufacturer of the Bushnell Haas agar. Microbiological growth was observed at the FAME–water interface of FAME obtained from residual lard. Using the MALDI-TOF mass spectrometry technique, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptomyces violaceoruber* bacteria were identified in the residual lard FAMES, with the latter being previously reported in FAMES. The implications of microorganism development on the physicochemical quality of FAMES are significant, as it leads to an increase in the acid index, which may negatively impact metals by inducing corrosion. The refined lard FAMES did not show any development of microorganisms. The present research concluded that residual lard tends to be more prone to microbiological attack if the conditions of water and temperature affect microbial growth. The findings will contribute to the knowledge base for a safer introduction of FAMES into the biofuel matrix.

Keywords: FAME; transesterification; microbiological degradation; waste utilization; MALDI-TOF; *Pseudomonas aeruginosa*; *Streptomyces violaceoruber*

1. Introduction

Fatty acid methyl esters (FAMES), which are the main components of biodiesel, are fuel with physical properties similar to petroleum-derived diesel [1], whose chemical composition is a mixture of alkyl esters, synthesized from triglycerides present in vegetable oil, animal fat, and their residues generated during food preparation. The traditional



Academic Editor: Spiros Paramithiots

Received: 13 March 2025

Revised: 11 July 2025

Accepted: 21 July 2025

Published: 4 August 2025

Citation: Lepe-de-Alba, S.; García-Gonzalez, C.; Solis-Dominguez, F.A.; Martínez-Miranda, R.; Carrillo-Beltrán, M.; Arcos-Vega, J.L.; Sagaste-Bernal, C.A.; Pérez-Sánchez, A.; Coronado-Ortega, M.A.; Ayala-Bautista, J.R. Comparison of Susceptibility to Microbiological Contamination in FAMES Synthesized from Residual and Refined Lard During Simulated Storage. *Appl. Biosci.* **2025**, *4*, 39. <https://doi.org/10.3390/applbiosci4030039>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

7.1.3 Artículo como primer autor, aceptado para publicarse en la revista IEEE, titulado “Comparision of oxidative stability indices between residual and refined lard”.

Comparision of oxidative stability indices between residual and refined lard biodiesel

Samuel Lepe-de-Alba
Instituto de Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja
California
Mexicali, México
samuel.lepe74@uabc.edu.mx

Conrado García-González*
Instituto de Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja
California
Mexicali, México
cnrdgarcia@uabc.edu.mx

Roberto Lopez-Avitia
Instituto Tecnológico de Mexicali
Tecnológico Nacional de México
Mexicali B.C., México
robertol.avitia@gmail.com

José L. Arcos-Vega
Instituto de Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja
California
Mexicali, México
arcos@uabc.edu.mx

Dafne G. Sepulveda-Vital
Facultad de Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja
California
Mexicali, México
dafne.sepulveda@uabc.edu.mx

Armando Pérez Sánchez
Facultad de Ciencias de la
Ingeniería y Tecnología
Universidad Autónoma de Baja
California
armando.perez.sanchez@uabc.edu.mx

Abstract—This study investigates the oxidative stability of biodiesel synthesized from residual and refined pork lard, focusing on three key indices: peroxide value (primary oxidation), p-anisidine value (secondary oxidation), and the total oxidation index (ToTox). Fatty acid methyl esters (FAME) were produced via alkaline transesterification and purified through successive water washes. The results revealed that biodiesel derived from residual lard exhibited significantly higher oxidative degradation, with ToTox values exceeding those reported for vegetable oil-based biodiesels. In contrast, refined lard biodiesel showed moderate oxidation levels but remains unsuitable for fuel production due to its competition with food resources. The elevated p-anisidine and peroxide values in residual lard biodiesel suggest potential risks for fuel stability and performance, underscoring the need for further research into antioxidant additives and optimized storage conditions to enhance the viability of animal fat-based biodiesel.

Keywords— Biodiesel, lard, transesterification, p-anisidine, peroxides, ToTox.

I. INTRODUCTION (HEADING 1)

The increasing energy demands, depletion of fossil fuels and environmental pollution make the world under crisis nowadays. This is because worldwide are dependent on petroleum as their main source of fuel. The only possible solution to solve the crisis is to find a renewable, economically feasible and environmentally friendly source of alternative energy [1]. Biodiesel is an alternative diesel fuel made from renewable sources such as a vegetable oils and animal fats. It is biodegradable, nontoxic and has a low emission profile and it is environmentally beneficial [2].

The most common method to produce biodiesel is synthesized via the transesterification of lipid feedstocks with low

molecular weight alcohols using alkaline bases to catalyze the reaction [3]

Oxidation stability is one of the important properties of fatty acid alkyl esters (biodiesel) and primarily affects the stability of biodiesel during extended storage. Degradation by oxidation produce products that may compromise biodiesel properties, impair fuel quality and engine performance [4]. Many factors can affect the oxidation stability of biodiesel like fatty acid composition, impurities (free fatty acids, additives and antioxidants, water), physical parameters (sample mass, agitation, viscosity, temperature, light and air exposure) as well as degree of prior sample aging [5].

According to ASTM D6751 [6], which defines the quality requirements for biodiesel (B100) intended for blending with conventional diesel fuel, oxidative stability is one of the key parameters. This property is assessed using the Rancimat method, a widely accepted technique for evaluating the resistance of biodiesel to oxidative degradation 3 hours minimum.

The Rancimat method determines the induction period (the time preceding the rapid deterioration of the fat), which is used to assess the relative oxidative stability of fats. In this method, the sample is exposed to a constant-temperature stream of air [7].

Peroxides are compounds that can significantly affect product quality, particularly in food systems including oils and fats. Their presence is indicative of lipid oxidation, a process that leads to rancidity and contributes to undesirable changes in samples. The determination of the p-anisidine value enables the calculation of the TOTOX index, which represents a combined measure of the peroxide value and p-anisidine value. By

7.1.4 Artículo como co-autor, aceptado para publicarse en la revista IEEE titulado “Corrosion Performance of copper in crude bioglycerol: Implications for biodiesel infrastructure”.

Corrosion Performance of Copper in Crude Bio-Glycerol: Implications for Biodiesel Infrastructure

Conrado Garcia-Gonzalez
Instituto de Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja
California
Mexicali, México
cnrdgarcia@uabc.edu.mx

Rogelio A. Ramos-Irigoyen*
Instituto de Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja
California
Mexicali, México
rramosi@uabc.edu.mx

José L. Arcos-Vega
Instituto de Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja
California
Mexicali, México
arcos@uabc.edu.mx

Samuel Lepe-de-Alba
Instituto de Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja
California
Mexicali, México
samuel.lepe@uabc.edu.mx

Juan R. Salinas Martínez
Instituto de Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja
California
Mexicali, México
juan.salinas@uabc.edu.mx

Ana M. Vázquez-Espinoza
Facultad de Ciencias
Administrativas e Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja
California
Mexicali, México
anyvazquez@uabc.edu.mx

Abstract— Crude bio-glycerol, a by-product of biodiesel production, contains residual impurities that challenge material integrity. Its corrosive behavior, especially toward copper components, threatens pipelines, tanks, and industrial systems. The central objective of this study is to evaluate the corrosive impact of crude bio-glycerol obtained via alkaline transesterification of waste vegetable oil on copper surfaces, using the ASTM D130 copper strip method. The findings aim to guide material selection and promote safer, more sustainable biodiesel infrastructure. Corrosion tests followed ASTM D130, yielding a 1a rating, with copper coupons showing slight, barely visible discoloration. While this suggests low corrosivity under test conditions, long-term exposure remains a concern. Trace contaminants such as methanol, free fatty acids, and salts may gradually degrade metallic components, especially under thermal or oxidative stress. Thus, careful material selection is advised for storage and transport systems involving copper or its alloys. Protective coatings, corrosion inhibitors, or more resistant materials may be needed to mitigate long-term effects. This issue is critical in industrial settings where bio-glycerol undergoes repeated thermal cycles or prolonged contact with reactive surfaces, potentially accelerating corrosion beyond what short-term tests reveal. The study also contributes to resource valorization and supports the development of sustainable biofuel infrastructure within a circular bioeconomy framework.

Keywords— Crude bio-glycerol, biodiesel by-products, renewable energy, copper corrosion, material compatibility, waste valorization, sustainable biofuel infrastructure.

I. INTRODUCTION

Glycerol also known as glycerin or glycerine is a trihydroxy alcohol (triol) with a propane backbone substituted at positions 1, 2, and 3 by hydroxyl groups (Figure 1).

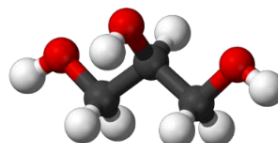


Fig. 1. Detailed molecular structure of glycerol [1].

It appears as a clear, colorless, odorless, and hygroscopic syrupy liquid, or as a solid below 64 °F [1]. Pure glycerol is chemically stable and generally non-reactive under standard storage and handling conditions, making it suitable for a wide range of pharmaceutical, cosmetic, and industrial applications [2-4].

However, the glycerol obtained as a by-product of biodiesel synthesis commonly referred to as crude bio-glycerol, contains a mixture of residual catalysts, soaps, methanol, and other organic impurities. Its composition varies depending on the feedstock and reaction conditions, particularly the type of catalyst used. Among the available methods, alkaline transesterification remains the most widely adopted due to its high conversion efficiency, operational simplicity, and cost-effectiveness [5]. The evaluation of the crude bio-glycerol is of great importance for the biodiesel industry profitability.

A key advantage of biodiesel production lies in its ability to utilize waste vegetable oils (WVO) as feedstock. Unlike virgin edible oils, waste oils do not compete with food supply chains, thereby mitigating concerns related to food security and land use. Their use promotes circular resource management by diverting post-consumer fats and oils from waste streams into renewable energy applications. This approach aligns with global

Constancia de aceptación de artículos

Submissions		Contact Chairs	Help Center	Select Your Role: Author	IEEECC2025	Conrado Garcia-Gonzalez
Author Console						
+ Create new submission		1 - 2 of 2		« « 1 » »	Show: 25 50 100 All	Clear All Filters
Paper ID	Title	Files	Status	Actions		
<input type="text"/> Clear	<input type="text"/> Clear					
34	Comparison of oxidative stability indices between residual and refined lard biodiesel Show abstract	Submission files: Ⓞ Articulo IEEEEX TJ final.pdf	Accept Reviews	Submission: Edit Submission Edit Conflicts Delete Submission		
114	Corrosion Performance of Copper in Crude Bio-Glycerol: Implications for Biodiesel Infrastructure Show abstract	Submission files: Ⓞ Corrosion Performance of Copper in Crude Bio-Glycerol V. Final.pdf	Accept Reviews	Submission: Edit Submission Edit Conflicts Delete Submission		

7.1.5 Participación en un congreso internacional CICITEC con el tema “Síntesis de biodiesel por método alcalino a partir de distintas fuentes de aceites vegetales y grasas animales”

**Universidad Autónoma de Baja California**
Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología
Unidad Valle de las Palmas

3th International Congress of Engineering Sciences and Technology
CICITEC 2021, grants this

CERTIFICATE

to
Samuel Lepe de Alba, Conrado Garcia González, Jazmín Lizeth Jiménez Nava, Ana Maria Vázquez Espinoza

For your oral presentation into the thematic session “Biofuels” with the work entitled:
Síntesis de biodiesel por método alcalino a partir de distintas fuentes de aceites vegetales y grasas animales
Tijuana, Baja California, México, September 22 to 24, 2021


Dr. Antonio Gómez Roa
Director de la FCITEC


Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez
Presidente del Comité Organizador


Dra. Norma A. Barboza Tello
Coordinadora de Investigación y Posgrado




Dr. Conrado Garcia Gonzalez
Vo.Bo. Director de Tesis



CONGRESO INTERNACIONAL
DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

7.1.6 Participación en un congreso internacional CICITEC con el tema “Comparison of the microbiological attack of biodiesel produced from different sources”

The certificate is presented on a white background with a light blue circuit-like pattern. At the top left is the seal of the Universidad Autónoma de Baja California. The text is centered and reads: 'Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Unidad Valle de las Palmas'. Below this, it states '4th International Congress of Engineering Sciences and Technology CICITEC 2023, grants this' followed by the word 'CERTIFICATE' in large, bold, blue letters. The recipient's name, 'Lepe de Alba Samuel, García González Conrado, Fernando Amilcar Solís Domínguez', is highlighted in yellow. The title of the participation, 'Comparison of the microbiological attack of biodiesel produced from different sources', is also highlighted in yellow. The location and dates, 'Tijuana, Baja California, México, August 23 to 25, 2023', are listed below. Two signatures are present: Dr. David Abdel Mejía Medina, Director de la FCITEC, and Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez, Coord. de Investigación y Posgrado. At the bottom, there are logos for RECIT, the Universidad Autónoma de Baja California seal, FCITEC, and the International Congress of Engineering and Technology Sciences.

**Universidad Autónoma de Baja California**
Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología
Unidad Valle de las Palmas

4th International Congress of Engineering Sciences and Technology CICITEC 2023, grants this

CERTIFICATE

to

Lepe de Alba Samuel, García González Conrado, Fernando Amilcar Solís Domínguez

For the participation entitled

Comparison of the microbiological attack of biodiesel produced from different sources

Tijuana, Baja California, México, August 23 to 25, 2023


Dr. David Abdel Mejía Medina
Director de la FCITEC


Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez
Coord. de Investigación y Posgrado

 RECIT

 **FCITEC**
Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología
Unidad Valle de las Palmas


INTERNATIONAL CONGRESS
OF ENGINEERING AND TECHNOLOGY SCIENCES

7.1.7 Participación en una ponencia como expositor con el tema “Problemática de la industria del biodiesel por contaminación microbiana”.



7.1.8 Participación en una ponencia como expositor con el tema “Determinación de propiedades antimicrobiológicas (*Azadirachta indica*), para su potencial uso como biocida en el biodiesel”

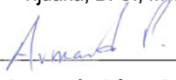


Samuel Lepe de Alba y Conrado García González

Por impartir a estudiantes del PE de Ingeniería Mecánica la conferencia: “**Determinación de propiedades antimicrobiológicas del Neem (*Azadirachta indica*), para su potencial uso como biocida en el biodiesel**” como parte de las actividades desarrolladas por el Cuerpo Académico Sistemas Termomecánicos Aplicados a la Ingeniería, realizado el 14 de noviembre 2024 en las instalaciones de la FCITEC.

Tijuana, B. C., México, a 14 de noviembre de 2024




Dr. Armando Pérez Sánchez
Responsable del CA Sistemas

Termomecánicos aplicados a la ingeniería


Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez
Coord. de Investigación y Posgrado



7.1.9 Certificados de derecho de autor

CERTIFICADO

Registro Público del Derecho de Autor

Para los efectos de los artículos 13, 162, 163 fracción I, 164 fracción I, y demás relativos de la Ley Federal del Derecho de Autor, se hace constar que la **OBRA** cuyas especificaciones aparecen a continuación, ha quedado inscrita en el Registro Público del Derecho de Autor, con los siguientes datos:

AUTORES: GARCIA GONZALEZ CONRADO
JIMENEZ NAVA JAZMIN LIZETH
LEPE DE ALBA SAMUEL
VAZQUEZ ESPINOZA ANA MARIA

TÍTULO: SINTESIS DE BIODIESEL POR METODO ALCALINO A PARTIR DE DISTINTAS FUENTES DE ACEITES VEGETALES Y GRASAS ANIMALES

RAMA: LITERARIA

TITULAR: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA (CON FUNDAMENTO EN EL ART. 83 DE LA L.F.D.A.)

Con fundamento en el artículo 3° de la Ley Federal del Derecho de Autor el presente certificado ampara única y exclusivamente la obra original Literaria.

Con fundamento en lo establecido por el artículo 14 fracciones I y III de la Ley Federal del Derecho de Autor, no es objeto de protección como derecho de autor: las ideas en sí mismas, las fórmulas, soluciones, conceptos, métodos, sistemas, principios, descubrimientos, procesos e invenciones de cualquier tipo; los esquemas, planes o reglas para realizar actos mentales, juegos o negocios.

Con fundamento en lo establecido por el artículo 168 de la Ley Federal del Derecho de Autor, las inscripciones en el registro establecen la presunción de ser ciertos los hechos y actos que en ellas consten, salvo prueba en contrario. Toda inscripción deja a salvo los derechos de terceros. Si surge controversia, los efectos de la inscripción quedarán suspendidos en tanto se pronuncie resolución firme por autoridad competente.

Con fundamento en los artículos 2, 208, 209 fracción III y 211 de la Ley Federal del Derecho de Autor; artículos 64, 103 fracción IV y 104 del Reglamento de la Ley Federal del Derecho de Autor; y artículos 1, 3 fracción I, 4, 8 fracción I y 9 del Reglamento Interior de Instituto Nacional del Derecho de Autor, se expide el presente certificado.

Número de Registro: 03-2022-082210505700-01

Ciudad de México, a 30 de agosto de 2022

EL JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INSCRIPCIÓN DE OBRAS


FRANCISCO ERASMO DE LOS SANTOS CORDERO



CULTURA
SECRETARÍA DE CULTURA



INDAUTOR
INSTITUTO NACIONAL DEL DERECHO DE AUTOR

CERTIFICADO

Registro Público del Derecho de Autor

Para los efectos de los artículos 13, 162, 163 fracción I, 164 fracción I, y demás relativos de la Ley Federal del Derecho de Autor, se hace constar que la **OBRA** cuyas especificaciones aparecen a continuación, ha quedado inscrita en el Registro Público del Derecho de Autor, con los siguientes datos:

AUTORES: GARCIA GONZALEZ CONRADO
LEPE DE ALBA SAMUEL
SOLIS DOMINGUEZ FERNANDO AMILCAR

TÍTULO: PROBLEMATICA DE LA INDUSTRIA DEL BIODIESEL POR CONTAMINACION MICROBIOLÓGICA

RAMA: LITERARIA

TITULAR: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA (CON FUNDAMENTO EN EL ARTICULO 83 DE LA L.F.D.A.)

Con fundamento en lo establecido por el artículo 3° de la Ley Federal del Derecho de Autor, el presente certificado ampara única y exclusivamente la obra original LITERARIA.

Con fundamento en lo establecido por el artículo 14 fracción I de la Ley Federal del Derecho de Autor, no es objeto de protección como derecho de autor: las ideas en sí mismas, las fórmulas, soluciones, conceptos, métodos, sistemas, principios, descubrimientos, procesos e invenciones de cualquier tipo.

Con fundamento en lo establecido por el artículo 168 de la Ley Federal del Derecho de Autor, las inscripciones en el registro establecen la presunción de ser ciertos los hechos y actos que en ellas consten, salvo prueba en contrario. Toda inscripción deja a salvo los derechos de terceros. Si surge controversia, los efectos de la inscripción quedarán suspendidos en tanto se pronuncie resolución firme por autoridad competente.

Con fundamento en los artículos 2, 208, 209 fracción III y 211 de la Ley Federal del Derecho de Autor; artículos 64, 103 fracción IV y 104 del Reglamento de la Ley Federal del Derecho de Autor; y artículos 1, 3 fracción I, 4, 8 fracción I y 9 del Reglamento Interior de Instituto Nacional del Derecho de Autor, se expide el presente certificado.

Número de Registro: 03-2023-060813205500-01

Ciudad de México, a 13 de junio de 2023

EL DIRECTOR DEL REGISTRO PÚBLICO DEL DERECHO DE AUTOR

JESÚS PARETS GÓMEZ



SECRETARÍA DE CULTURA
INSTITUTO NACIONAL DEL
DERECHO DE AUTOR
DIRECCIÓN DE REGISTRO
PÚBLICO DEL DERECHO DE
AUTOR



CULTURA
SECRETARÍA DE CULTURA



INDAUTOR
INSTITUTO NACIONAL DEL DERECHO DE AUTOR

CERTIFICADO

Registro Público del Derecho de Autor

Para los efectos de los artículos 13, 162, 163 fracción I, 164 fracción I, y demás relativos de la Ley Federal del Derecho de Autor, se hace constar que la **OBRA** cuyas especificaciones aparecen a continuación, ha quedado inscrita en el Registro Público del Derecho de Autor, con los siguientes datos:

AUTORES: CARRILLO BELTRAN MONICA
GARCIA GONZALEZ CONRADO
LEPE DE ALBA SAMUEL
SOLIS DOMINGUEZ FERNANDO AMILCAR

TÍTULO: DETERMINACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA CONTAMINACION MICROBIANA DE BIODIESEL (B100) PRODUCIDO CON MANTECA DE CERDO RESIDUAL Y REFINADA

RAMA: LITERARIA

TITULAR: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA (CON FUNDAMENTO EN EL ARTICULO 83 DE LA L.F.D.A.)

Con fundamento en lo establecido por el artículo 3° de la Ley Federal del Derecho de Autor, el presente certificado ampara única y exclusivamente la obra original solo literaria.

Con fundamento en lo establecido por el artículo 14 fracción I de la Ley Federal del Derecho de Autor, no es objeto de protección como derecho de autor: las ideas en sí mismas, las fórmulas, soluciones, conceptos, métodos, sistemas, principios, descubrimientos, procesos e invenciones de cualquier tipo.

Con fundamento en lo establecido por el artículo 168 de la Ley Federal del Derecho de Autor, las inscripciones en el registro establecen la presunción de ser ciertos los hechos y actos que en ellas consten, salvo prueba en contrario. Toda inscripción deja a salvo los derechos de terceros. Si surge controversia, los efectos de la inscripción quedarán suspendidos en tanto se pronuncie resolución firme por autoridad competente.

Con fundamento en los artículos 2, 208, 209 fracción III y 211 de la Ley Federal del Derecho de Autor; artículos 64, 103 fracción IV y 104 del Reglamento de la Ley Federal del Derecho de Autor; y artículos 1, 3 fracción I, 4, 8 fracción I y 9 del Reglamento Interior de Instituto Nacional del Derecho de Autor, se expide el presente certificado.

Número de Registro: 03-2024-050312112800-01

Ciudad de México, a 07 de mayo de 2024

EL DIRECTOR DEL REGISTRO PÚBLICO DEL DERECHO DE AUTOR

JESÚS PARETS GÓMEZ



CULTURA
SECRETARÍA DE CULTURA



INDAUTOR
INSTITUTO NACIONAL DEL DERECHO DE AUTOR