

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN
DE BIODIESEL Y EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS DE ALTO
VALOR COMERCIAL A PARTIR DEL CARDO MARIANO
(*SILYBUM MARIANUM*) CULTIVADO EN MÉXICO**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA VEGETAL**

PRESENTA

CRISTINA FINK ESQUEDA

TUTOR:

DR. JOSÉ DE ANDA SÁNCHEZ

COTUTOR:

DR. JUAN CARLOS MATEOS DÍAZ

ASESORES:

DRA. JANET MARÍA LEÓN MORALES

DRA. MARIANA A. ARMENDÁRIZ RUIZ

DR. JOSÉ MANUEL RODRÍGUEZ DOMÍNGUEZ

AGOSTO DE 2021, ZAPOPAN

Guadalajara, Jalisco a 13 de agosto de 2021
(Fecha 30 días previos a la realización del examen.)

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Cristina Fink Esqueda**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL Y EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS DE ALTO VALOR COMERCIAL A PARTIR DEL CARDO MARIANO (SILYBUM MARIANUM) CULTIVADO EN MÉXICO” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica en la opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 13 del mes de agosto del año 2021.



José de Anda Sánchez
Nombre y firma
Director de tesis/tutor académico



Juan Carlos Mateos Díaz
Nombre y firma
Co-director de tesis/tutor en planta



Janet María León Morales
Nombre y firma
Asesor/Asesora



José Manuel Rodríguez Domínguez
Nombre y firma
Asesor/Asesora



Ignacio Orozco Ávila
Nombre y firma
Asesor/Asesora



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 17 de agosto de 2021
CP/950/2021

CRISTINA FINK ESQUEDA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1703CA6347
PRESENTE

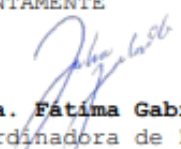
Por este medio le informo que el trabajo de tesis "**Desarrollo de un protocolo para la obtención de biodiesel y extracción de productos de alto valor comercial a partir del cardo mariano (*Silybum marianum*) cultivado en México**" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dr. José de Anda Sánchez. Director de tesis
Dr. Juan Carlos Mateos Díaz Co-director de tesis
Dr. Ignacio Orozco Ávila. Co-director de tesis
Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez. Asesor de tesis
Dra. Janet María León Morales. Asesora de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE


Mtra. Estíma Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados



Av. Normalistas No. 800, Colinas de La Normal, CP. 44270, Guadalajara, Jal., México.
Tel: (33) 3345 5200 informes@ciatej.mx www.ciatej.mx



AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Agradecimientos a:

CONACYT por el financiamiento del trabajo a través del proyecto Fondo Mixto CONACYT-JALISCO-2016 con clave JAL-2016-02-01-278983.

CIATEJ por la facilitación de sus instalaciones y equipos.

CIATEQ por la facilitación de sus instalaciones y equipos.

Agradezco a cada uno de los miembros de mi comité por la guía y apoyo incondicional que me brindaron para la realización de este trabajo.

También agradezco a mi asesora la Mtra. Alejandra Anahí Martínez Delgado quien me brindo apoyo invaluable en la realización de este trabajo.

De igual manera agradezco por su amable y atento apoyo a María Angélica Galicia Romero, representante de "El Plantario" farmacia viva, con quien en conjunto realizamos los experimentos del cultivo de las plantas de cardo mariano.

También agradezco a Felisa León Raymundo presidenta del Centro Integral Xihuipatli quien me brindo guía acerca de las plantas medicinales y de las personas que las cultivan.

Agradezco a cada uno de los maestros, doctores y compañeros del CIATEJ que siempre me brindaron invaluable y amable atención.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1. Definición de términos básicos.....	9
2.2. Bases teóricas.....	11
2.2.1. Biodiesel.....	11
2.2.2. Descripción de la planta <i>Silybum marianum</i>	13
2.3. Antecedentes de la investigación.....	17
2.4. Uso del aceite de <i>Silybum marianum</i> para producción de biodiésel y obtención de silimarina	19
3. Formulación del problema.....	23
4. Justificación de la investigación.....	23
4.1.1. Viabilidad de la investigación	25
4.2. Limitaciones del trabajo de investigación.....	25
5. HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	25
5.1. Hipótesis.....	25
5.2. Variables y definición operacional	25
6. Objetivos de la investigación.....	28
6.1.1. Objetivo general.....	28
6.1.2. Objetivos específicos.....	28
7. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	28
7.1. Colecta de semillas e identificación taxonómica	28
7.2. Seguimiento del desarrollo del cultivo.....	29
7.3. Caracterización de semillas y extracción del aceite.....	29
7.8. Cálculo de rendimientos	32
8. RESULTADOS	33
9. CONCLUSIONES.....	50
10. REFERENCIAS CITADAS	52

RESUMEN

El cardo mariano, *Silybum marianum*, es una especie con gran contenido de aceite en semillas (22%-46%) que puede ser aprovechado para producir biodiésel. Además, contiene componentes biológicamente activos, como la silimarina, que pueden ser obtenidos como subproductos de alto valor. Sin embargo, debido a factores como la variedad o condiciones de cultivo, el contenido de aceite y otros compuestos puede variar. Por esto, en el presente trabajo se analizó el potencial para producir biodiésel del cardo mariano cultivado en México, caracterizando el aceite, biodiésel obtenido y los extractos etanólicos con metabolitos de interés. El contenido de aceite fue del 23%, con 3.79% de acidez, por lo que se realizó la transesterificación alcalina. Obteniendo un rendimiento de 82% (± 0.0167) en una reacción de 15 minutos. La densidad del biodiésel se encuentra dentro del rango de los estándares del ASTM D6751. Se requieren seis plantas para producir un litro de biodiésel. La concentración de silimarina encontrada fue de 9.6 mg/g de semilla. Las plantas produjeron semillas maduras a partir de los 260 días de su germinación y terminaron su ciclo a los 360 días. Produjeron 90 flores por planta y 147 semillas por flor en promedio.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la búsqueda de alternativas energéticas renovables y amigables con el medio ambiente es de gran importancia debido a la creciente demanda energética, la disminución de las reservas de energéticos no renovables y la necesidad de disminuir la dependencia de los energéticos que causan contaminación en el medio ambiente y otras problemáticas como la emisión de gases de efecto invernadero que aportan al calentamiento global con todas sus consecuencias (United Nations Foundation, 2017).

La energía nos permite realizar diversas actividades que son fundamentales para la calidad de vida que gozamos actualmente y mantener la economía global. Nos provee movilidad y transporte, regulación de la temperatura, luz y muchos otros servicios de gran importancia en prácticamente todas las actividades que realizamos hoy en día los seres humanos. “De acuerdo con las necesidades de la sociedad humana, hoy difícilmente existe alguna herramienta la cual, de alguna manera, no esté asociada con la electricidad” (Bokor, 2013).

La humanidad es prácticamente dependiente de las distintas formas y fuentes de energía para realizar sus actividades. Muchas de estas actividades están ligadas al desarrollo económico, por lo tanto, si la energía es la fuente con la cual se realizan estas actividades, la energía también está ligada al desarrollo económico. Mientras más energía, más actividades se pueden realizar y más crecimiento económico habrá. También hay que tomar en cuenta el uso eficiente de la misma (Rodríguez, 2020). “Una de las bases más importantes de la sociedad son las fuentes de energía, su rol en el día a día demuestra su gran significado en la supervivencia de las formas avanzadas actuales de sociedad” (Bokor, 2013).

En la actualidad, aproximadamente un tercio del consumo energético global proviene del petróleo. A pesar de que en el periodo de 1999 a 2014 su consumo global fue disminuyendo gradualmente, en los años posteriores ha incrementado en promedio de 1.2 Mb/día a 1.6Mb/día. En contraste, la producción de petróleo aumentó solo en 0.4 Mb/día. Por lo que se puede deducir que la producción no está a la par de la demanda. Los países que muestran un mayor aumento en la producción global se encuentran en el Medio Oriente, mientras que la producción fuera de esta área está decayendo. Lo que sugiere un aumento en la importación y una disminución en la soberanía energética de los países que no tengan otras alternativas energéticas (BP, 2017).

Otra de las desventajas del petróleo y de los combustibles fósiles en general es que producen dióxido de carbono, que es el principal gas de efecto invernadero que se emite a la atmósfera, y carecen de un mecanismo para mantener un ciclo neutro de carbono. El aumento del efecto

invernadero causa el calentamiento global y por consiguiente el cambio climático. Este cambio en la temperatura promedio del planeta tierra amenaza el desarrollo económico global, a las distintas especies de animales y plantas, a los ecosistemas, la integridad humana e incluso la vida. Se prevé que causará inundaciones y un aumento de desastres naturales (IPCC, 2021). Por lo que han surgido diversos programas para combatir esta problemática, como por ejemplo el Tratado de París para el Cambio Climático y las Metas para el Desarrollo Sustentable de la Organización de las Naciones Unidas, en los cuales se apoya el desarrollo de energías alternativas renovables y la eficiencia energética (United Nations Foundation, 2017).

Las predicciones realizadas y publicadas cada año por la International Energy Agency nos dan una idea del panorama energético en el futuro. Se predice que la demanda de energía global va a seguir aumentando hasta un 30% para el 2040 en conjunto con la población. Se estima que, debido a las nuevas políticas públicas, la tendencia será la disminución en el porcentaje de la demanda global de carbón y el aumento de las energías renovables en un 40%. Sin embargo, la demanda de petróleo seguirá creciendo, aunque con una tasa de crecimiento que disminuirá gradualmente, se mantendrá debido a la falta de alternativas para el transporte por carretera, la aviación y los petroquímicos (International Energy Agency, 2017).

En México el panorama es parecido al mundial. A partir de aproximadamente el año 2015 la demanda energética del país superó a la producción, lo cual significa que no hay una seguridad energética total y que debemos importar energía de otros países. Aún dependemos en gran medida de la energía producida a partir del petróleo, representando un 62% en el año 2016 (SENER, 2016).

No hay una respuesta única para resolver el problema de lograr la suficiencia energética y tal parece que se debe impulsar el uso conjunto de distintas energías renovables por varias razones: cada tipo de energía requiere una cierta fuente que no se encuentra en todas las regiones, las energías renovables provenientes de fuentes como el sol o el viento son variables, el tener varias fuentes previene la dependencia a una sola, cada fuente de energía es más apropiada para diferentes usos o actividades, y existen distintas actividades que generan diferentes subproductos o residuos que pueden ser aprovechados. Por ejemplo, para usar energía de la marea se requiere estar cerca de un cuerpo de agua, o para usar la energía eólica se necesita estar en un lugar que sople el viento de manera relativamente continua y a una velocidad suficiente, para la energía solar se prefieren sitios con mayor radiación solar; por lo tanto, cada fuente podrá ser aprovechada dependiendo de la zona en la que se encuentre (Falco & Mastrandrea, 2014).

Existen ciertas energías renovables que son muy impredecibles debido a que sus fuentes dependen de las condiciones climáticas como, por ejemplo: la solar, la eólica y la energía de las mareas. Esta desventaja las inhabilita a garantizar una producción de energía que sea estable e ininterrumpida. Por lo tanto, buscando una solución a esta situación se encontró que el combinar dos o más sistemas de energías renovables distintas que se apoyen entre ellas puede resultar en una producción suficientemente estable (Lim, 2012).

Fuentes de energía renovable con esta variabilidad se pueden apoyar con fuentes de energía de producción más estable, como por ejemplo la biomasa y biocombustibles para lograr una producción más estable y con los beneficios que aportan ambas fuentes (Falco & Mastrandrea, 2014).

Las energías renovables al ser distintas entre ellas promueven el uso diversificado de las mismas. Un país o región al desarrollar varias fuentes distintas de energías renovables promueve la independencia a una sola forma de energía, de una tecnología o combustible, y reduce el riesgo de tener un problema de suministro y fluctuación de los precios (Armstrong & Hamrin, 2000).

Desde la perspectiva de los usos: a la generación de electricidad se le relaciona con las fuentes de energía eólica, solar, hidroeléctrica, bioenergía, geotermal y marina; a la generación de calor con la geotermal, bioenergía y solar; y al área de transporte con los biocombustibles. La biomasa puede provenir de distintas actividades como subproducto o residuo que puede ser aprovechado, y se puede convertir en distintas formas de bioenergía dependiendo de su naturaleza (Ellabban, Abu-Rub, & Blaabjerg, 2014).

Los biocombustibles como el biodiésel han sido considerados como una alternativa para reducir la dependencia de los combustibles fósiles, aunque pueden tener ventajas y desventajas. El biodiésel tiene como ventaja que es un producto renovable, que potencialmente posee un ciclo de carbono neutro, puede ser utilizado en motores de diésel fabricados después del año de 1993, su eficiencia es aproximadamente igual a la del petrodiesel, y potencialmente tiene menos emisiones de monóxido de carbono y otros contaminantes (Pacific Biodiesel, 2016). Dentro de las desventajas se encuentra su competencia con el mercado alimenticio, en el caso que los aceites provengan de plantas que se encuentran dentro de este mercado (Atabani, y otros, 2012). También pueden potencialmente producir más contaminantes como el óxido de nitrógeno, por lo que se les debe efectuar pruebas para confirmar que están dentro de los estándares deseados (Pacific Biodiesel, 2016). Su producción puede causar impactos ambientales como el cambio de uso

de suelo forestal a agrícola, erosión de suelos, contaminación por uso de pesticidas y fertilizantes, uso poco eficiente del agua para regar los cultivos, entre otros. Otro punto importante es que el proceso muchas veces no es redituable económicamente al no poder competir con los precios del diésel convencional.

Por todas las situaciones mencionadas anteriormente en el presente trabajo se buscó una alternativa que ayude a aminorar las desventajas del biodiésel pudiendo aprovechar al mismo tiempo sus ventajas. La alternativa propuesta fue elegir una planta oleaginosa que contenga un aceite que cumpla con las características necesarias para producir biodiésel, que no tenga competencia con la industria alimenticia, que pueda crecer en México y potencialmente en la zona del Estado de Jalisco, que tenga bajos requerimientos de agua y nutrientes, que tenga el potencial de ser cultivada en sistemas de agricultura innovadores urbanos o más sustentables para evitar el uso de agroquímicos y la deforestación, que contenga uno o varios compuestos de alto valor para la industria farmacéutica que puedan ser aprovechados, a la par de los aceites, como producto(s) principal(es) y hacer potencialmente redituable la producción. La planta elegida para este propósito fue el Cardo Mariano (*Silybum marianum*) ya que cumple con todos los requerimientos mencionados anteriormente, más adelante se describen con más detalle sus características.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Definición de términos básicos

Carbono neutro: Con respecto a actividades en general “...cualquier actividad que no libera dióxido de carbono neto a la atmósfera.” Específicamente en cuanto a los biocombustibles “...la cantidad de dióxido de carbono liberado cuando el (bio) combustible es quemado se cree que es la misma que la cantidad de dióxido de carbono que absorbieron las plantas cuando crecieron” (Wood, 2015).

Ácidos grasos: “Ácidos monocarboxílicos alifáticos derivados de o contenidos en una forma esterificada en grasa, aceite o cera animal o vegetal. Naturalmente los ácidos grasos comúnmente tienen una cadena de 4 a 28 átomos de carbón (usualmente sin ramificaciones y en números pares), la cual puede ser saturada o insaturada. Como extensión, el termino es algunas veces usado para abarcar todos los ácidos carboxílicos alifáticos acíclicos” (IUPAC, 2014).

Ácidos grasos saturados: “...un ácido graso en el cual las moléculas de hidrocarbóno tienen un átomo de hidrógeno en cada carbono y por lo tanto está completamente hidrogenada. La

molécula es muy estable (usualmente sólida a temperatura ambiente) y difícil de romper...” (Sebley, 2016).

“...la cadena de carbonos no contiene insaturaciones entre los átomos de carbono, por lo tanto, no se pueden incorporar más átomos de hidrógeno” (Dictionary.com, s.f.).

Ácidos grasos insaturados: “Los ácidos grasos insaturados tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono. El término insaturado indica que menos del número máximo de átomos de hidrógeno están ligados a cada carbono en la molécula. El número de dobles enlaces está indicado por los nombres genéricos- monoinsaturado para moléculas con un doble enlace o poliinsaturado para moléculas con dos o más dobles enlaces” (Thompson, 2020).

Triglicérido (TAG): “Los triglicéridos se componen de 3 ácidos grasos esterificados a una columna de glicerol. ‘Triacilgliceroles’ es el nombre químico correcto...” (Graham, 2014).

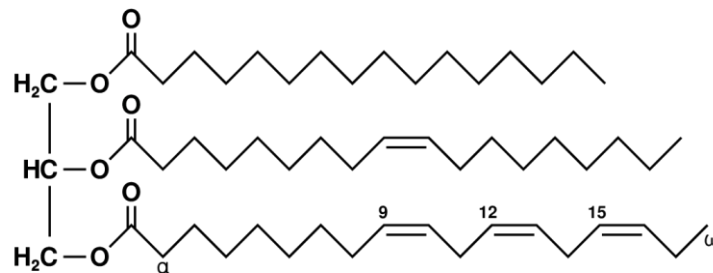


Figura 1. Ejemplo de la estructura de un triglicérido. (Wikipedia, 2020)

Porcentaje de Ácidos Grasos Libres: “Los ácidos grasos libres en un aceite son ácidos grasos que se han perdido del TAG o se ha separado de moléculas de aceite” (Wiesman, 2009).

“El porcentaje de ácidos grasos libres es la proporción peso a peso de ácidos grasos dentro de una muestra de aceite” (Da Tech, 2012).

“El incremento de la cantidad de ácidos grasos libres en una muestra de grasa o aceite indica la hidrólisis de los triglicéridos. Esta reacción ocurre debido a la acción de la enzima lipasa y es un indicador de un procesamiento o almacenamiento con condiciones inadecuadas (altas temperaturas o humedad relativa, daño del tejido). El origen de la enzima puede ser del mismo tejido del cual el aceite o la grasa fue extraído o puede ser debido a una contaminación de otras células incluyendo microorganismos” (Vitz, et al., 2020).

Éster: “Compuestos oficialmente derivados de un oxácido y un alcohol, fenol, ...o enol uniéndose por un enlace formado por la pérdida de agua de un grupo hidroxilo ácido y un grupo hidroxilo del último” (IUPAC, 2014).

Transesterificación: “La transesterificación es un proceso donde un éster es transformado a otro a través del intercambio de sus mitades alcoxi. Ya que la reacción es básicamente un proceso en equilibrio, la transformación ocurre esencialmente por simplemente mezclar los dos componentes. Sin embargo, se ha sabido ya por largo tiempo que la reacción es acelerada por un ácido o base catalizadora” (Otera, 1993).



Figura 2. Ejemplo de una reacción de transesterificación.

Alcohol + éster → Alcohol diferente + éster diferente (Wikipedia, 2020).

En cuanto a la transesterificación de un triglicérido a biodiesel en la presencia de una base catalizadora como NaOH. Un triglicérido puede reaccionar con 3 moléculas de alcohol pequeñas, como metanol, sustituyendo la “columna” de glicerol. Creando 3 ésteres separados de más baja masa molecular que son ésteres etílicos de ácidos grasos/ésteres metílicos de ácidos grasos, o sea biodiésel (Fukuda et al., 2001).

Flavonolignanos: “Los Flavonolignanos constituyen a una clase importante de metabolitos secundarios formados por el acoplamiento de un flavonoide y una mitad de fenilpropanoide. El extracto estandarizado rico en flavonolignanos preparado de frutas de *Silybum marianum* es conocido como silimarina y ha sido usado medicinalmente por largo tiempo...” (AbouZid et al., 2017).

Vilano: “Apéndice de pelos o filamentos que corona el fruto de muchas plantas compuestas y le sirve para ser transportado por el aire” (Real Academia Española, 2019).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Biodiesel

El biodiésel es una mezcla de ésteres alquílicos de cadena larga, obtenido de ácidos grasos derivados de aceites vegetales, grasas animales o aceites de desecho. Se produce a través de una reacción de transesterificación de un triacilglicérido con alcohol en presencia de un

catalizador (ácido, básico o enzimático); su eficiencia es aproximadamente igual a la del petrodiesel, y numerosas investigaciones han demostrado sus beneficios ambientales, considerándolo un combustible limpio debido a su ciclo de carbono que contribuye a la reducción de la emisión de gases de efecto invernadero y gases tóxicos como monóxido de carbono o hidrocarburos aromáticos policíclicos (Zunta Raia et al., 2017; Pacific Biodiesel, 2016; Atabani et al., 2012). Es una alternativa al diésel convencional, sus materias primas son biológicas y renovables. Es biodegradable y no tóxico, y tiene un perfil bajo de emisiones en general (Krawczyk, 1996).

Sin embargo, la producción de biodiesel conlleva algunas desventajas como que el proceso de obtención puede no ser redituable económicamente, la competencia con el mercado alimenticio, erosión y posibles cambios de uso de suelo, además del uso poco eficiente del agua de riego. Debido a esto, las malezas son consideradas una alternativa para cultivos energéticos, sin competir con el sector alimentario, pues crecen con pocos requerimientos nutricionales en tierras no aprovechables para la alimentación. Adicionalmente, las malezas que contengan productos de alto valor comercial pueden generar procesos redituables (Atabani, y otros, 2012).

Uno de los mayores problemas del biodiesel es su alto costo al ser comercializado. Por lo que el proceso debe ser aprovechado junto con sus coproductos y subproductos para hacerlo más accesible. Como por ejemplo el aprovechamiento de coproductos de alto valor, la recuperación de glicerina y sales de potasio que sirven como fertilizantes (Fangurai Ma, 1999) (Torroba, 2020).

Para la síntesis de biodiesel, dependiendo del porcentaje de ácidos grasos libres del aceite se deben tomar distintas vías en la esterificación. Si el porcentaje es menor al 5% se procede directamente a la transesterificación alcalina, y si es mayor al 5% se debe realizar previamente una esterificación ácida o enzimática para posteriormente efectuar la alcalina. Posteriormente, se debe efectuar un lavado del cual se puede obtener glicerina y sales del catalizador utilizado en la transesterificación. Finalmente, se separa el biodiesel del agua (Gerpen 2005).

2.2.2. Descripción de la planta *Silybum marianum*

El cardo mariano (*Silybum marianum* L.), es una especie que ha sido señalada por su potencial energético, pues contiene gran cantidad de aceite en semillas, reportado entre 22%-46%, además de una baja acidez que simplifica su proceso de conversión a biodiésel (El-Mallah, 2003; Mohammed Takase, 2014). Asimismo, esta planta presenta componentes biológicamente activos, como la silimarina, que pueden ser obtenidos como subproductos de alto valor generando el potencial para la elaboración del biodiésel de manera redituable.

El cardo mariano es nativo de la región mediterránea, sin embargo, actualmente está distribuida en diversas regiones del planeta. Se le puede encontrar en Norte y Sudamérica, Oceanía, África y Asia. En México se le considera una especie exótica, en expansión y en proceso de naturalización. Se encuentra mayormente en el Estado de México, Ciudad de México e Hidalgo; de igual manera se le ha localizado en Jalisco. Crece comúnmente en terrenos baldíos, orillas de caminos y campos de pastoreo; en tierras secas, arenosas y rocosas (CONABIO, 2009). Se encuentran registros de su presencia en el país desde el año 1849 (Cumplido, 1849).

Sus categorías taxonómicas son: "Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares); Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas); División: Magnoliophyta (plantas con flor); Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas); Subclase: Asteridae; Orden: Asterales." (CONABIO, 2009)



Figura 3. Posiblemente la primera ilustración que muestra el cardo mariano en México (Cumplido, 1849).



Figura 4. Fotografías de *Silybum marianum*. A) Izquierda superior: flor. B) Izquierda inferior: semillas. C) Derecha: vista completa de la planta. (Kelch, 2001)

Su descripción e identificación basada de acuerdo con Rzedowski y Rzedowski (2001) es una hierba anual o bianual, erecta, con hasta 2 m de altura, tallo robusto con pelos ligeramente aracnoides (como telaraña). Las hojas inferiores forman una roseta basal, oblongas a elípticas en contorno general, con espinas de hasta 8 mm de largo en el margen. Las inflorescencias son cabezuelas solitarias o agrupadas en pequeños números. Las flores son de 2.5 a 4 cm de largo, las interiores son lineares y sin espinas, las demás son ovadas y espinosas en el margen, terminan en una punta espinosa de hasta 5 cm de largo, donde dentro de las mismas se encuentran numerosas semillas, los pétalos son de color rosado-morado. Una planta puede tener hasta más de 100 flores (CONABIO, 2009).

El *Silybum marianum* es una planta considerada como maleza que posee importantes propiedades medicinales y que a la par posee potencial como sustrato para biocombustibles (Sharma, 2006; CONABIO, 2009; Shu Yun Zhu, 2014).

Contiene una mezcla de flavonolignanos que colectivamente se les llama silimarina, y se encuentran mayormente en las semillas. Los constituyentes principales de la silimarina son la taxifolina, la silicristina, la silidianina, silibina A y B, e isosilibina A y B (Cai et al., 2009).

Se ha evaluado su uso en el tratamiento de cáncer de próstata, y presenta actividad antioxidante; hay estudios que sugieren que protege contra daño genómico, aumenta la

síntesis de proteínas del hígado, disminuye la actividad de los promotores de tumores, disminuye el metabolismo del calcio, entre otras propiedades benéficas para la salud (M.D. Kenneth Flora, 1997; Paula R. Davis-Searles, 2005; R.J. Martin, 2006; Ahlam Elwekeel, 2013).

La concentración de silimarina y otros compuestos que el cardo mariano sintetiza varía dependiendo de distintos factores, así como la variedad de la planta, las condiciones de desarrollo, la nutrición, la cantidad de agua que recibe, el genotipo, entre otros factores (Hammouda, 1993; Martin, 2006; Elwekeel, 2013). Hevia et al. reportaron diferencias en la cantidad de semillas y porcentaje de silimarina entre un genotipo alemán y uno chileno bajo las mismas condiciones de cultivo. También reportaron diferencias significativas de 10-43 mg/g en el contenido de silimarina en 25 ecotipos de Nueva Zelanda. Por su parte, en el contenido de aceite también se han registrado importantes variaciones, por ejemplo, desde el 26% al 31% en cuatro diferentes variedades provenientes de distintos países. (Fathi-Achachlouei & Azadmard-Damirchi, 2009).

Hay varios estudios en los que se busca maximizar la cantidad de silimarina en el cultivo del cardo mariano, ya que es un compuesto medicinal de alto valor agregado. Por ejemplo, Hevia et al. (2007) definieron el mejor tiempo de cosecha según el número de flores maduras, el porcentaje de semillas maduras, el peso de las semillas y el contenido de silimarina para dos genotipos del cardo mariano, uno chileno y otro alemán. Se sembró en una parcela dividida en bloques aleatorios, las semillas se contaron a mano y se pesaron en una balanza analítica. Las flores del genotipo alemán presentaron una mayor cantidad de semillas maduras y semillas de mayor peso, sin embargo, el genotipo chileno registró la mayor cantidad de silimarina. En cuanto al tiempo de cosecha se determinó que para ambos genotipos el momento en el que hay cuatro (4) flores maduras es el que resulta con un mayor número de semillas maduras y porcentaje de silimarina.

En cuanto al contenido de aceites en las semillas existe algo de discrepancia entre estudios: 22% según El-Mallah (2003) y 46% según Takase (2014). De acuerdo con la composición de su aceite (Tablas 2-5), es una planta que puede ser utilizada para producir biodiesel (El-Mallah, 2003; Mohammed Takase, 2014).

Tabla 1. Composición de ácidos grasos en el aceite de las semillas de *Silybum marianum* (El-Mallah, 2003).

Ácidos grasos		
Insaturados	75.10%	
	Ácido Linoleico	53.30%
	Ácido Oleico	21.30%
	Ácidos grasos libres	0.68%
Saturados	15%	
	Ácido palmítico	9.40%
	Ácido esteárico	6.60%

Tabla 2. Composición de triacilgliceroles en el aceite de las semillas de *Silybum marianum* por porcentaje en peso (El-Mallah, 2003).

Triacilgliceroles	Porcentaje en peso
LLL	16.60%
LLO	17.40%
LLP	12.30%
LOO	11.30%
LOP	12.10%

Tabla 3. Composición de tocoferoles en el aceite de las semillas de *Silybum marianum* (El-Mallah, 2003).

Tocoferoles totales	260 ppm
alfa-tocoferol	84.50%
beta-tocoferol	9.90%

Tabla 4. Composición de esteroides en el aceite de las semillas de *Silybum marianum* (El-Mallah, 2003).

Esteroides	(600mg/100g)
Sitosterol	57.40%
7-stigmasterol	20.40%
Stigmasterol	6.80%
Campesterol	6.10%
Avenasterol	5.50%
Isofucosterol	2.90%
Colesterol	0.90%

2.2.3. Proceso comercial de extracción de silimarina

Comúnmente la silimarina es extraída a través de un proceso de dos pasos que es recomendado por la Farmacopea Europea. Primeramente, ya que las semillas contienen una cantidad de aceite considerable, se efectúa un desenasado con hexano (Wianowska & Wisniewski, 2015). Posteriormente, se procede a la extracción de la silimarina a través de solventes orgánicos polares como etanol o metanol (Ramawat & Merillon, 2008).

2.3. Antecedentes de la investigación

La conversión de triglicéridos de aceites vegetales a ésteres monoalquílicos de ácidos grasos, en otras palabras, el proceso de transesterificación, en realidad no es novedoso. Desde el año de 1953 se reportaron las primeras transesterificaciones que fueron realizadas por Duffy y Patrick (Feofilova et al. 2010). Curiosamente antes de que se inventara el motor de diésel (Demirbas, 2008).

Posteriormente, en el año de 1893 en Alemania el doctor Rudolph Diesel comenzó a publicar sus teorías acerca de un nuevo motor térmico (Mollenhauer & Tschoeke 2010). En estos tiempos otros motores térmicos estaban en uso, pero no eran tan eficientes, como la máquina de vapor o el motor de Otto que precede al motor de gasolina moderno. (Demirbas, 2008).

Diesel se basó en las teorías de Sadi Carnot que hablaban de un motor que podía tener una eficiencia mayor (Lynwood, 1969). La teoría de Carnot decía que la eficiencia en el ciclo aumenta con respecto a la diferencia en proporción del volumen de un gas cuando está comprimido contra cuando se encuentra en expansión total. Diesel quería aplicar esta teoría a un motor de combustión interna. El problema con otros motores de este tipo para lograr compresiones mayores era que inyectan aire que viene previamente mezclado con combustible, por lo que al querer comprimirlo hasta el punto máximo la combustión ocurría antes de llegar al punto de compresión deseada para lograr mayor eficiencia; aparte de que la combustión ocurría fuera del tiempo apropiado y en una forma no controlada (Demirbas, 2008).

Para el año de 1897, después de varios años de trabajo, Diesel logró demostrar el correcto funcionamiento de un motor que lograba la compresión deseada en la que posteriormente se inyecta el combustible obteniendo una eficiencia considerablemente superior a la de los otros motores (Demirbas, 2008).

Diesel usaba distintos aceites vegetales, como el de hemp o cacahuete, para aprovisionar de combustible a sus motores. En 1900 durante una exposición en Paris usó aceite de cacahuete. De igual manera en 1911 durante la Feria del Mundo en Paris, dijo "el motor diésel puede ser

alimentado con aceite vegetal y ayudará considerablemente en el desarrollo de la agricultura de los países que lo usen” (Demirbas, 2008).

Esta tendencia duró pocos años después de la muerte de Diesel en 1913, hasta los 20's, debido al incremento del uso del petróleo. Al refinar el petróleo queda como subproducto el petrodiesel a un costo muy accesible que terminó desplazando a los aceites vegetales. Por consiguiente, los motores diésel producidos a partir de esta época sufrieron modificaciones para adaptarse a la menor viscosidad del petrodiesel. Por lo que de ahí en adelante estos motores dejaron de ser compatibles con los aceites vegetales debido a su mayor viscosidad (Demirbas, 2008).

Posteriormente, en distintas épocas del resto de los 1900's en las que existieron situaciones de escases de combustible derivado del petróleo, sobre todo en 1970, regresó la idea de buscar combustibles de origen vegetal. Es aquí donde después de muchos años vuelve a entrar el tema de la transesterificación. La transesterificación de los aceites separa las moléculas de mayor tamaño en tres moléculas de menor tamaño, cambiando así la viscosidad del aceite a una menor que es compatible con los motores diésel actuales (Demirbas, 2008).

Este interés ha crecido aún más desde los 1990s debido a las problemáticas ambientales y económicas actuales como el calentamiento global. A finales de 1990s comenzó la producción comercial de biodiesel. Desde entonces muchas plantas de producción han sido construidas alrededor del mundo y su producción sigue creciendo (Demirbas, 2008).

Atabani et al. (2012) publicaron una reseña, reuniendo información de fuentes de alto rango y verificadas, acerca de varios aspectos del biodiesel como sus materias primas, métodos de extracción y producción, propiedades y cualidades, ventajas y desventajas, viabilidad económica y perspectivas a futuro. Concluyeron que, debido a la esperada disminución de los combustibles fósiles, los problemas ambientales y el crecimiento del sector de transporte, el biodiesel es uno de los recursos más prometedores. Existen distintas materias primas de las que se puede obtener biodiesel y este es uno de sus puntos a favor. Sin embargo, se estima que el 75% del costo de producción es debido a la materia prima por lo que es de suma importancia escoger una fuente que sea económicamente viable. Atabani et al. (2012) concluyen que la búsqueda de materias primas para biodiesel se debe enfocar en fuentes que no compitan con el mercado alimenticio, que dentro de lo posible no contribuyan a la deforestación, bajo uso de agua, que aporten a la reducción de gases de efecto invernadero, entre otros factores relacionados.

Una recopilación de distintos análisis de ciclo de vida del biodiésel concluye que hay grandes discrepancias entre los distintos análisis. Sin embargo, se pudo observar que las emisiones de los gases de efecto invernadero y N_2O del biodiésel están relacionadas en parte al uso de energía para su producción y en mayor medida a las emisiones causadas por la deforestación debida a el cambio de uso de suelo y el uso del suelo para cultivos. (Malça & Freire, 2011). Sin embargo, es una fuente alterna de energía que debe considerarse a nivel local sobre todo cuando las fuentes de obtención de combustibles fósiles están cada vez más comprometidas a nivel mundial.

2.4. Uso del aceite de *Silybum marianum* para producción de biodiésel y obtención de silimarina

Por primera vez, Abdelrahman et al. (2012) realizaron la transesterificación de aceite de semillas de cardo mariano como una fuente novedosa de materia prima para biodiesel. Se seleccionó una transesterificación en dos pasos debido a la acidez del aceite. Primeramente, se realizó una esterificación usando ácido clorhídrico como catalizador ácido, con una proporción de 6:1 de metanol a $60^{\circ}C$ durante una hora. Posteriormente, se prosiguió a la transesterificación, en la que los valores de las variables fueron optimizados. Se tomó en cuenta el tipo de catalizador alcalino y su concentración, la proporción metanol aceite, la temperatura y el tiempo de reacción. Los resultados indicaron que los valores óptimos fueron 0.90% p/p de hidróxido de potasio a aceite, 6:1 de metanol a aceite, $60^{\circ}C$ durante 100 minutos y el biodiésel cumplió con los estándares internacionales de ASTM.

Un año después se publicó un trabajo en el cual se realizó una optimización de la transesterificación alcalina en un paso de aceite de cardo mariano (Ahmad et al., 2013). Se estudiaron 4 variables la proporción de los reactivos, la concentración del catalizador, la temperatura y el tiempo de reacción. Y obtuvieron un rendimiento del 80% con un tiempo de reacción de 75 minutos a $60^{\circ}C$ usando una proporción molar de 5:1 de metanol a aceite. También se determinó el orden de los factores de acuerdo a su efecto sobre el rendimiento de biodiésel y fueron los siguientes (del más significativo al menos significativo): concentración del catalizador, tiempo de reacción, temperatura de la reacción y proporción de metanol aceite. Las propiedades del biodiésel obtenido cumplieron con los estándares del ASTM. También se determinó que una mezcla B50 de aceite puro de cardo mariano puede ser utilizada en motores convencionales.

Posteriormente en China se realizó una investigación en la que se evaluaron distintas variables para la transesterificación alcalina en un paso (Takase et al., 2014). Las variables de estudio

fueron dos métodos de agitación y el uso de etanol o metanol. Primeramente, se caracterizaron los aceites, resultando en un 46% de contenido de aceite y un contenido de ácidos grasos libres muy bajo de 0.68%. Estos resultados difirieron con el aceite de otros estudios, sugiriendo que las características del aceite pueden variar dependiendo del cultivo y de la genética de las plantas. Los resultados mostraron que los dos métodos de agitación, ultrasonicación y agitación convencional, tuvieron rendimientos similares. Sin embargo, con la combinación de ultrasonicación y un menor tiempo de reacción obtuvieron un rendimiento ligeramente mayor. Bajo las mismas condiciones la ultrasonicación resultó en un mayor grado de conversión de los aceites. El uso de metanol resultó tener un rendimiento de 95.75% y el etanol de un 92.32%. Los valores óptimos de las variables de estudio resultaron ser ultrasonicación, metanol con una proporción de 8:1, catalizador de hidróxido de potasio en la cantidad de 1.5% p/p, una temperatura de 60°C durante 20 minutos. El biodiésel resultó tener la mayor parte de sus propiedades dentro de los estándares internacionales, sin embargo, la estabilidad oxidativa y el índice de yodo quedaron fuera. Se menciona que, debido a la abundancia del cultivo de cardo mariano en este país y su valioso coproducto, la silimarina, el aceite de cardo mariano es una alternativa viable de aceite no comestible para producción de biodiésel en China y otros países que lo cultiven.

Fadhel et al., 2015 evaluaron el efecto de un primer paso de esterificación con catalizador ácido (carbón sulfatado) en la producción de biodiésel a partir de aceite de semillas de *Silybum marianum* L. con alto contenido de ácidos grasos libres, seguido de una transesterificación básica. El catalizador ácido de carbón se obtuvo convirtiendo tereftalato de polietileno (PET) en carbón activado que posteriormente fue sulfatado. Las variables que se buscó optimizar fueron la cantidad del catalizador ácido, la proporción de metanol y aceite, la temperatura y tiempo de reacción. La esterificación, usando este catalizador, logró reducir la cantidad de ácidos grasos libres a un nivel suficiente para proceder a la transesterificación básica. Las condiciones óptimas encontradas fueron 6% p/p del catalizador ácido, 15:1 en proporción de metanol aceite, una temperatura de 68°C y 180 minutos de reacción. El catalizador se podía reutilizar para posteriores reacciones, sólo que iba bajando su desempeño en cada una, llegando a un 60% en el 5° uso. La energía de activación de este primer paso fue de 70.98 kJ/mol. El aceite esterificado procedió a ser transesterificado con metanol y un catalizador básico. El biodiésel obtenido resultó tener un rendimiento de 96.98% y pureza de 96.69% p/p utilizando 0.8% p/p de hidróxido de potasio, una proporción de 6:1 de metanol aceite y una temperatura de 60 °C durante 75 minutos con una agitación de 600 rpm. La energía de

activación resultó ser de 17.92 kJ/mol. El biodiésel producido cumplió con los estándares de la regulación internacional del ASTM D 6751 y EN 142114.

Finalmente, Takase et al. (2018) publicaron un trabajo en el cual se creó un catalizador alcalino a partir de un tipo de arcilla tratada químicamente. Se determinaron las condiciones óptimas con las que se obtuvo un rendimiento de 93.5%. Las condiciones fueron una proporción de metanol aceite de 12:1, 12% w/w de catalizador, temperatura de 65°C con una duración de 5 horas. Debido a que el catalizador es heterogéneo se puede separar y reutilizar. El catalizador pudo ser reutilizado 4 veces consecutivas. Las propiedades del biodiésel resultaron comparables a los estándares internacionales.

Tabla 5. Comparación entre las distintas investigaciones que utilizan aceite de semillas de *Silybum marianum* para producción de biodiésel.

País	Nivel de AGL	Proceso	Alcohol	Catalizador	Proporción Alcohol/Aceite	Temperatura	Tiempo	Rendimiento	Cumple Estándares ASTM	Conclusión extra	Referencia
Iraq	Alto	Transesterificación en dos pasos	Metanol	1.0% p/p HCl, 0.90% p/p KOH	6:1	60°C	60 min 100 min	95%	Sí	Primer estudio de uso de aceite de cardo mariano para biodiésel	Abdelrahman et al., 2012
Pakistán	Bajo	Transesterificación alcalina en un paso	Metanol	Metóxido de sodio	5:1	60°C	75 min	80%	Sí	Se puede usar aceite puro de cardo mariano en mezcla B50 en motores diésel.	Ahmad et al., 2013
China	0.68% = Bajo	Transesterificación alcalina en un paso	Metanol vs. Etanol	KOH 1.5% p/p	8:1 Metanol/Aceite	60°C	20 min	Metanol 95.75%, Etanol 92.32%	Mayormente, menos la estabilidad oxidativa y el índice de yodo. Se menciona que se puede estabilizar fácilmente.	Caracterización del aceite difiere en distintos estudios. La agitación por ultrasonificación es superior a los métodos de agitación convencionales en cuanto a la reducción del tiempo de reacción y el aumento del rendimiento.	Takase et al., 2014
Iraq	Alto	Transesterificación en dos pasos	Metanol	Catalizador creado a partir de PET heterogeneo reutilizable. Segundo paso 0.8% KOH.	15:1, 6:1	68°C, 60°C	180 min, 75 min	96.98%	Sí	El catalizador heterogeneo se pudo reutilizar hasta 5 veces. Su rendimiento fue bajando en cada reacción hasta llegar a un 60%.	2015
Ghana	Bajo	Transesterificación alcalina en un paso	Metanol	Catalizador creado a partir de arcilla tratada químicamente. Heterogeneo y reutilizable. 12% p/p	12:1	65°C	300 min	93.00%	Sí	El catalizador pudo ser separado y reutilizado 4 veces consecutivas.	Takase et al., 2018

3. Formulación del problema

Debido a la creciente demanda energética, la disminución de los recursos no renovables de los que actualmente dependemos mayormente para su producción y los problemas ambientales que conlleva, actualmente se buscan alternativas económica y ambientalmente sostenibles (United Nations Foundation, 2017).

La soberanía energética se ve afectada cuando un país o región no es capaz de producir su propia energía *in situ* o con sus propios recursos. Actualmente, México no produce toda la energía que utiliza, dependemos en un 28% de la importación de recursos de otros países para generarla (SENER, 2016).

El biodiésel es una de las energías alternativas que se consideran como parte de la solución. Sin embargo, así como posee ventajas también posee desventajas como la competencia de sus materias primas con el mercado alimenticio; los impactos ambientales causados por su cultivo como el uso ineficiente del agua, el cambio de uso de suelo y la contaminación debida a pesticidas y fertilizantes químicos; los altos costos del cultivo de la materia prima que lo hacen poco competitivo en el mercado, su potencial de producir contaminantes como el óxido de nitrógeno, entre otras (Pacific Biodiesel, 2016; Atabani et al., 2012). De acuerdo con una compilación de análisis de ciclo de vida de la producción de biodiésel esta puede generar más gases de efecto invernadero en su producción que los que fija en el crecimiento de las plantas. Sobre todo, por el cambio de uso de suelo y en parte por la energía que se utiliza en el proceso.

4. Justificación de la investigación

El biodiésel es una fuente de energía renovable que podría disminuir la dependencia de recursos no renovables, que puede ser producida en distintos países y regiones aumentando su soberanía energética, que tiene un ciclo potencialmente neutro de carbono en cuanto a la quema de combustible vs. la captura de dióxido de carbono por medio de las plantas cultivadas. También puede ser utilizado en la mayoría de los motores diésel actuales (Pacific Biodiesel, 2016).

Las malezas, como el cardo mariano, son interesantes para la producción de biodiésel ya que dadas sus características podrían ser una fuente de recursos que aminore varias de las desventajas que tiene. El cardo mariano tiene bajos requerimientos hídricos y nutricionales, por lo que aminora la cantidad de agua requerida y el uso de agroquímicos. También puede crecer en suelo pobre donde otros cultivos no pueden crecer y no se le considera como una fuente de alimento importante, por lo tanto, no compite con el mercado alimenticio. Por el

mismo motivo no es necesario invadir terreno de zona forestal para su cultivo, aminorando parte del impacto reportado en los análisis de ciclo de vida del proceso (Atabani, y otros, 2012).

La silimarina, una mezcla de metabolitos de interés producidos por esta planta, posee un valor interesante en el mercado, por lo que el extraerla y comercializarla a la par de la producción de biodiésel podría cubrir los costos del cultivo y así tener un precio capaz de competir con el del petrodiésel.

Esta investigación aportará conocimiento acerca del *Silybum marianum* cultivado en México a cielo abierto, para saber si sus aceites tienen las mismas cualidades reportadas en otras investigaciones de otros países. Saber si su aceite tiene las cualidades necesarias para producir biodiésel como el reportado en otros países. Esto permitirá saber si esta es una opción viable en nuestro país como ya se ha investigado en otras latitudes.

Se desarrollará un protocolo que permitirá aprovechar los aceites para producción de biodiésel a la par de la mezcla de compuestos de alto valor denominada silimarina (Kvasnicka et al., 2003). Otras investigaciones reportan resultados de la investigación de ambos productos por separado (Takase et al., 2014), pero no hay uno que reporte aprovecharlos en conjunto. El protocolo incluirá la caracterización de las semillas, la extracción de sus aceites, la extracción de silimarina, el análisis de los extractos, la conversión del aceite en biodiésel y la caracterización de este.

Este mismo protocolo con sus modificaciones necesarias puede servir de guía y aplicarse para explorar la viabilidad de otras plantas oleaginosas con el mismo propósito de encontrar procesos que hagan económicamente redituable la producción de biodiésel, tomando en cuenta otros factores mencionados en la sección que hace referencia a la descripción de la problemática.

Explorar esta posibilidad nos hace avanzar un paso más hacia encontrar una manera económica y ambientalmente sustentable de producir biodiésel, que finalmente contribuye a aporta conocimiento para afrontar la problemática energética y ambiental actual. Tener una nueva fuente de producción de biodiésel dentro del país ayudaría a cubrir parte de la demanda apoyando a la soberanía energética. Esto contribuiría a reducir el problema con respecto al límite de las reservas energéticas no renovables y a las consecuencias ambientales que amenazan los ecosistemas del planeta (Pacific Biodiesel, 2016).

4.1.1. Viabilidad de la investigación

Se contó con el apoyo del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ) para financiar el tiempo y los materiales necesarios para realizar esta investigación. Los equipos de investigación requeridos por el proyecto serán facilitados por el CIATEJ y el CIATEQ. Se cuenta también con el apoyo en cuanto a conocimientos y guía de los investigadores el Dr. José de Anda Sánchez, el Dr. Juan Carlos Mateos Díaz, la Dra. Janet María de León Morales, el Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez y la Dra. Mariana A. Armendáriz Ruiz. Así como el apoyo y asesoría de la Mtra. Alejandra Anahí Martínez Delgado.

4.2. Limitaciones del trabajo de investigación

Una de las limitaciones que se han encontrado en esta investigación es en cuanto a la posibilidad de obtener cantidades de más de 200 gramos de semillas de *Silybum marianum*. Esto se debe a que deben provenir de una fuente confiable que este certificada en cuanto a su autenticidad o que se pueda obtener el ejemplar completo para ser llevado a un herbario para su identificación taxonómica. Esto ya fue posible a través de la opción de la identificación taxonómica, realizada en el herbario de la Universidad de Guadalajara, pero la cantidad de semillas es limitada. Por esta misma razón el número de réplicas estará limitado a 5 muestras iguales de aproximadamente 30 gramos cada una.

5. HIPÓTESIS Y VARIABLES

5.1. Hipótesis

El *Silybum marianum* cultivado a cielo abierto en México tiene el potencial suficiente para ser una opción viable para la producción de biodiésel, en cuanto a la cantidad y calidad del aceite, del biodiésel y la silimarina de sus semillas; así como las características del cultivo como la cantidad de flores con semillas y el tiempo que toma cosecharlas.

5.2. Variables y definición operacional

Cantidad de flores por planta

- Definición conceptual: Número de flores producidas por planta de cardo mariano madura.
- Definición operacional: Número de flores en una planta de cardo mariano madura contadas a mano. El número de flores se cuenta en el momento de la cosecha.

Unidad: flores/planta.

Cantidad de semillas por flor

- Definición conceptual: Cantidad en peso de semillas recolectadas por flor.
- Definición operacional: Se extraen las semillas de las flores y se separan. Finalmente se pesan todas las semillas y se divide el peso entre el número total de flores.

Unidad: gramos/flor.

Contenido de aceite de las semillas

- Definición conceptual: Porcentaje en peso del aceite extraído de las semillas recolectadas de cardo mariano.
- Definición operacional: Primeramente, se secan las semillas en un horno para remover el agua que contengan. Se muelen y se maceran en hexano. El hexano se filtra y se evapora en un rotavapor para poder obtener el aceite puro. El peso del aceite se divide entre el peso de las semillas de la muestra y el resultado se multiplica por 100. Unidad: Porcentaje de aceite por peso.

Porcentaje de ácidos grasos libres del aceite

- Definición conceptual: “El porcentaje de ácidos grasos libres es la proporción peso a peso de ácidos grasos libres dentro de una muestra de aceite” (Da Tech, 2012).
- Definición operacional: Se mide a través de la prueba colorimétrica de Kwon & Rhee (1896).

Unidad: porcentaje en peso de ácidos grasos libres.

Cantidad de silimarina extraída

- Definición conceptual: Cantidad extraída de silimarina en cada muestra de semillas.
- Definición operacional: Posteriormente a ser desengrasadas las semillas molidas, se recuperan y se maceran en etanol. Se filtra el etanol y se evapora en un rotavapor para obtener la silimarina. Finalmente, a través del HPLC se determina la cantidad de silimarina por cada muestra.

Unidad: mg de silimarina por gramos de extracto etanólico

Características del biodiesel

- **Rendimiento de Recuperación**

- Definición conceptual: “Proporción entre el producto o el resultado obtenido y los medios utilizados” (RAE, 2019) En este caso es la proporción entre el peso biodiésel producido y el aceite utilizado.
- Definición operacional: Se pesa el aceite que se utiliza para la transesterificación. Se pesa el biodiésel producido. Se divide el peso del aceite entre el peso del biodiesel de acuerdo con la siguiente ecuación según Abdelrahman (2012):

$$\frac{\text{Volumen del biodiésel}}{\text{Volumen del aceite}} \times 100 = \% \text{Rendimiento (1)}$$

De igual manera se puede obtener el rendimiento con los resultados de la cromatografía de capa fina (TLC) que nos dan un aproximado de conversión del aceite a biodiésel (Villalpando, 2019).

Unidad: Porcentaje en peso.

- **Composición cualitativa de ácidos grasos**

- Definición conceptual: Comparación proporcional entre los distintos componentes de la reacción de síntesis de biodiésel (monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, ácidos grasos libres y ésteres etílicos) en distintos tiempos progresivos de la reacción (Villalpando, 2019).
- Definición operacional: Por medio de una TLC se hace un seguimiento de la reacción de síntesis de biodiesel en distintos tiempos progresivos; en el tiempo cero, 15 minutos, 30 minutos y 45 minutos. Se puede observar en la placa como los triglicéridos se convierten en ésteres etílicos y el grado de conversión final (rendimiento).

6. Objetivos de la investigación

6.1.1. Objetivo general

El objetivo de la investigación es analizar el potencial del biodiésel y del producto de alto valor comercial, silimarina, a partir del aceite de las semillas del cardo mariano (*Silybum marianum*) cultivado a cielo abierto en México. El alcance del proyecto de investigación incluye el desarrollo de protocolos a nivel laboratorio de extracción y análisis de los aceites de las semillas de la planta, conversión a biodiésel, extracción y análisis de la silimarina como producto de alto valor.

6.1.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar taxonómicamente el *Silybum marianum* colectado.
- b) Realizar un seguimiento cualitativo y cuantitativo durante el desarrollo de flores en plantas de *Silybum marianum* cultivadas a cielo abierto en Cuajimalpa, Ciudad de México.
- c) Caracterizar la composición del aceite crudo obtenido de las semillas de *Silybum marianum*.
- d) Producir biodiésel a nivel laboratorio y realizar su caracterización.
- e) Analizar cualitativa y cuantitativamente la mezcla de compuestos de alto valor, silimarina, en el extracto etanólico de las semillas de *Silybum marianum*.

7. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

7.1. Colecta de semillas e identificación taxonómica

Las semillas se obtuvieron de plantas cultivadas, a cielo abierto y sin ningún tipo de manejo, en el centro de cultivo de plantas medicinales llamado “El Plantario” farmacia viva que es un espacio donde se cultivan plantas endémicas, nacionales y extranjeras con propiedades medicinales ubicado en el poblado de San Pablo Chimalpa, Delegación Cuajimalpa, Ciudad de México. En esta área el clima es semifrío subhúmedo (INAFED, s.f.). La cosecha de las semillas corresponde al año 2019. Se recolectaron 300 flores para disponer de sus semillas y llevar a cabo los análisis posteriores. En 2018 un par de flores colectadas en el mismo sitio fueron llevadas al herbario de la Universidad de Guadalajara para su identificación y verificar que correspondía a la especie *Silybum marianum*. Se utilizaron las claves taxonómicas de la especie para identificarla.

7.2. Seguimiento del desarrollo del cultivo

El cultivo se efectuó a cielo abierto en el traspatio de las instalaciones de “El Plantario” ubicadas en la delegación de Cuajimalpa en la Ciudad de México.

Primeramente, se sembraron 10 semillas de cardo mariano de la cosecha del año 2019 directamente en el suelo. La mitad de las semillas se plantaron a 1 cm de profundidad y la otra mitad a 2 cm. Se monitoreo el tiempo de germinación.

La mitad de las plantas se sembraron en sol directo y la otra mitad bajo la sombra de un árbol.

Cada semana se midió el diámetro de las rosetas de las plantas para medir el ritmo de su crecimiento vegetativo.

Se registraron los tiempos de las diferentes etapas del desarrollo de las plantas. El tiempo de desarrollo vegetativo, floración y fin de su ciclo.

Se registró el número de flores por planta y el número de semillas por flor.



Figura 5. Mapa de la distribución de las plantas de cardo mariano cultivadas.

7.3. Caracterización de semillas y extracción del aceite

Las semillas maduras se separaron del resto del tejido vegetal. Se obtuvo el peso total de la muestra de semillas con una balanza analítica.

Se pesó un gramo de semillas por triplicado y se contó el número de semillas por gramo para determinar el peso promedio por semilla.

Para el registro del peso seco, se separaron las semillas en 5 muestras de 32 g cada una y se secaron en un horno a 40°C durante 24 h. Lo anterior debido a que el secado de las semillas es fundamental para evitar que el aceite extraído se contamine con agua y tenga riesgo de degradarse. Al finalizar el secado se volvieron a pesar las semillas para determinar su peso seco. Posteriormente, se pulverizó cada muestra por separado en un molino eléctrico para semillas Hamilton Beach modelo 80350R.

Para el proceso de extracción de los aceites, el tejido vegetal de cada muestra se maceró en hexano en una proporción 1:10 (peso/volumen) en botellas ámbar durante 24 horas. Pasado este tiempo, las muestras se sonicaron durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras se filtraron al vacío para separar el tejido vegetal del disolvente. Este proceso se repitió tres veces. Finalmente, para obtener el aceite puro, se evaporó a sequedad en un rotavapor con baño maría a 36°C, para evitar degradar el aceite.

Las muestras se almacenaron hasta su utilización en un ultra congelador a -18°C en frascos ámbar de vidrio. El aceite obtenido se pesó y se comparó su peso con el peso seco de semillas para calcular el porcentaje de aceite.

$$\frac{\text{Peso aceite (g)}}{\text{Peso semillas (g)}} \times 100 = \% \text{ aceite (2)}$$

7.4. Determinación del porcentaje de ácidos grasos libres

El porcentaje de acidez del aceite y del biodiésel se midió a través del método colorimétrico de Kwon & Rhee (1896) utilizando como referencia una curva estándar con concentraciones conocidas de ácido oleico.

Es importante medir el porcentaje de ácidos grasos libres en una muestra de aceite antes de transesterificarla ya que dependiendo del porcentaje de acidez se determina el método específico con el cual se puede efectuar la reacción, ya sea por vía química ácida o alcalina, o enzimática.

7.5. Síntesis de biodiésel a partir del aceite de *Silybum marianum*

Dado que el porcentaje de ácidos grasos libres en el aceite fue menor al 5% la síntesis de biodiesel se realizó por transesterificación alcalina directa. Generalmente se prefiere esta vía debido a que es la más sencilla y con menor costo, pero sólo los aceites con baja acidez son aptos para esta vía.

Ya que las muestras de aceite demostraron tener características prácticamente idénticas se mezclaron y se separaron en 3 muestras de 10 ml para la síntesis de biodiésel.

La transesterificación se efectuó dentro de un matraz bola sobre una parrilla de calentamiento con agitación magnética utilizando las siguientes condiciones: una proporción de 0.6:1 de etóxido de potasio con respecto al aceite, 360 rpm y temperatura de 60°C durante una hora. El curso de la reacción se determinó cualitativamente por Cromatografía de Capa Fina (CCF) cada 15 minutos. El tiempo de culminación obtenido en la primera reacción se utilizó para las posteriores.

El lavado del biodiésel se efectuó de la siguiente manera. En una pera de separación se colocó el biodiésel, se agregó agua destilada gota a gota en una proporción de 0.6:1 con respecto al biodiésel y ácido fosfórico al 1% (peso/volumen) atomizado en una proporción de 1:1. Se dejó que se separen las fases durante unos minutos para posteriormente separar el agua y el ácido del biodiésel (que queda en la parte superior de las fases). Se hizo un segundo lavado usando agua destilada en una proporción de 5:1 con respecto al biodiesel. Se dejó reposar en la pera de separación para que se separen las fases y posteriormente se retiró el agua.

Se efectuó una TLC para corroborar la compleción de la reacción de transesterificación a cada una de las muestras.

Para medir el rendimiento de recuperación se comparó el volumen del aceite antes de la reacción contra el del biodiésel en una probeta graduada. Y se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Volumen del biodiésel}}{\text{Volumen del aceite}} \times 100 = \% \text{Rendimiento (1)}$$

7.6. Determinación de la densidad

La densidad del aceite y de biodiésel se midió utilizando matraces aforados de uno y dos mililitros. Se aforó el aceite en los matraces y se pesó en una balanza analítica previamente tarada. Las mediciones se realizaron por triplicado. Para calcular la densidad se dividió el peso del aceite sobre el volumen correspondiente.

7.7. Extracción de silimarina de las semillas y análisis por HPLC de la silimarina extraída

Para el proceso de extracción de la silimarina el tejido vegetal ya seco, anteriormente desengrasado en por medio de la extracción hexánica, se maceró en etanol con una proporción 1:10 (peso/volumen) en botellas ámbar durante 24 horas. Pasado este tiempo, las muestras se sonicaron durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras se filtraron al vacío para separar el tejido vegetal del disolvente. Este proceso se repitió tres veces.

Finalmente, para separar el extracto se evaporó a sequedad en un rotavapor con baño maría a 36°C, para evitar degradar la silimarina.

Las muestras se almacenaron en frascos ámbar de vidrio. El extracto obtenido se pesó.

Para el análisis por HPLC se tomó como referencia la metodología de Wianowska y Wisniewski (2014). Se utilizó una columna Thermo Scientific c18 Hypersil Gold con una longitud de 100 mm, 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm. Por lo cual se hicieron algunos ajustes al método. Se utilizó un flujo de 0.5 ml/min y un volumen de inyección de 12.6 µl. El gradiente entre las fases móviles A y B se hizo del minuto 0 al 18.9, 100%A y 0%B; del 18.9 al 23.6, 0%A y 100%B; y del minuto 24.3 al 26, 100%A y 0%B. Los estándares que se utilizaron fueron los de silibinina >98% de pureza grado HPLC y silimarina de Sigma.

7.8. Cálculo de rendimientos

Con el fin de calcular el número de plantas requeridas para producir 1 litro de biodiésel se utilizaron los datos obtenidos, los datos teóricos reportados en la literatura y las siguientes fórmulas:

Despejando la ecuación 1 se obtuvo el volumen de aceite requerido para producir un volumen de biodiésel deseado con respecto al rendimiento de la transesterificación.

$$\frac{\text{Volumen del biodiésel}}{\% \text{Rendimiento} / 100} = \text{Volumen del aceite (3)}$$

Para el peso del aceite requerido se multiplicó el volumen del aceite requerido por la densidad medida del aceite.

$$\text{Volumen aceite (ml)} \times \text{Densidad aceite} \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) = \text{Peso aceite (4)}$$

El peso de semillas requeridas se calculó despejando la ecuación 2. El número de semillas requeridas se calculó dividiendo el peso requerido de semillas entre el peso unitario de las semillas medido.

$$\frac{\text{Peso aceite (g)}}{\frac{\% \text{aceite}}{100}} = \text{Peso seco semillas (g) (5)}$$

$$\frac{\text{Peso semillas (g)}}{\text{Peso unitario semillas (g)}} = \# \text{ de semillas (6)}$$

Para obtener el número de flores requeridas se dividió el número de semillas entre el número teórico de semillas por flor.

$$\frac{\# \text{ de semillas}}{\text{semillas} / \text{flor}} = \# \text{ de flores (7)}$$

Finalmente, el número de plantas requeridas para obtener el volumen de biodiésel deseado se calculó dividiendo el número de flores requeridas entre el número de flores por planta teórico.

$$\frac{\# \text{ de flores}}{\text{flores} / \text{planta}} = \# \text{ de plantas (8)}$$

8. RESULTADOS

8.1. Colecta de semillas e identificación taxonómica

Se visitaron dos instalaciones en la Ciudad de México en la que se produce el cardo mariano con fines medicinales. Ambas están afiliadas a la Secretaría de Desarrollo Rural y Equidad para las Comunidades (SEDEREC) y tienen una producción certificada como orgánica. La primera, "Farmacia Viva" ubicado en la delegación de Cuajimalpa en la Ciudad de México. La segunda fue el Centro Integral Naturista Xihuitpatli. Ubicado en Allende #30, Santo Tomás Ajusco, delegación Tlalpan (Ver figura 5).

En ambas instalaciones se observó que el cardo mariano es cultivado al aire libre con un clima semifrío subhúmedo (INAFED, s.f.). A las plantas no se les aplican ningún manejo. Se deja que las mismas germinen solas de las semillas de las plantas anteriores. No se les aplica ningún tipo de nutrición.

Se observó un importante crecimiento vegetativo, ya que las plantas llegan a medir hasta más de dos metros de altura. Una vez que florecen y maduran la planta muere.



Figura 6. De izquierda a derecha: fotografía del invernadero "El Plantario", Fotografía del consultorio del Centro Integral Xihuitpatli, Invernadero del Centro Integral Xihuitpatli.

Las semillas se colectaron de plantas cultivadas en el centro de cultivo de plantas medicinales llamado "Farmacia Viva", con las coordenadas 19.343031, -99.312196, ubicado en el poblado

de San Pablo Chimalpa, Delegación Cuajimalpa, Ciudad de México. En esta área el clima es semifrío subhúmedo (INAFED, s.f.). La cosecha de las semillas corresponde al año 2019.



Figura 7. Mapa del sitio de colecta.




Figura 8. Fotografías de las flores recolectadas.


En 2018 un par de flores colectadas en el mismo sitio fueron llevadas al herbario de la Universidad de Guadalajara para ser identificadas. Se utilizaron las claves taxonómicas de la especie. Se corroboró que se tratan de ejemplares de *S. marianum*. En la imagen a continuación, un extracto del certificado de identificación taxonómica. El número de muestra es el SIST-TRA-2018-8.

Núm. de muestra	Nombre científico	Familia
SIST-TRA-2018-8	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Asteraceae


ATENTAMENTE


Dr. Daniel Sánchez Carbajal
 Representante de la Unidad de Sistemática
 Laboratorio Nacional de Identificación y
 Caracterización Vegetal, Universidad de Guadalajara

Vo. Bo.


Dr. Pablo Carrillo Reyes
 Curador Herbario, "Luz María Villarreal de Puga"
 (IBUG), Instituto de Botánica de la Universidad de
 Guadalajara

Este documento contiene información propiedad de LaníVeg. Cualquier divulgación a terceros debe ser autorizado por el Responsable Técnico. Las copias autografiadas que aparecen en el documento original se encuentran resguardadas por el responsable de control de documentos. Cualquier documento que no lleve el sello de Copia Controlada será considerado como Copia No Controlada.



www.laniveg.com

Figura 9. Extracto del documento de identificación taxonómica del cardo mariano emitido por el herbario de la UDG.

Una de las claves taxonómicas más características que sirve para poder diferenciar al cardo mariano de otros cardos a los que se le parece en México son los filamentos del vilano. Los filamentos de los vilanos de los demás cardos son plumosos (Ver figura 11), mientras que los filamentos del vilano del cardo mariano son lisos (Ver figura 12).



Figura 10. Fotografía de la estructura de las semillas del cardo mariano. Incluye el vilano y un pétalo adheridos a la semilla.

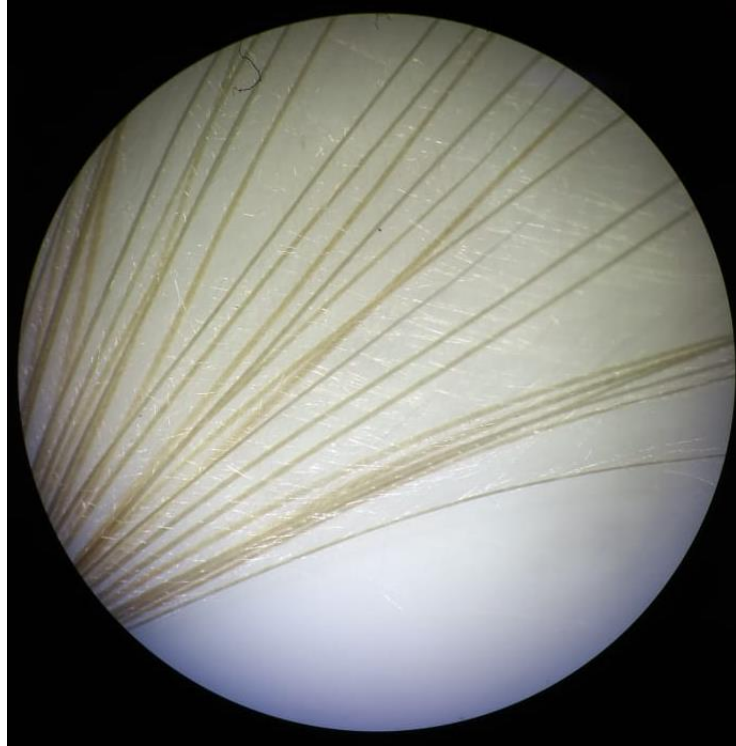


Figura 11. Fotografía de ejemplo de filamentos plumosos de un vilano bajo el microscopio.

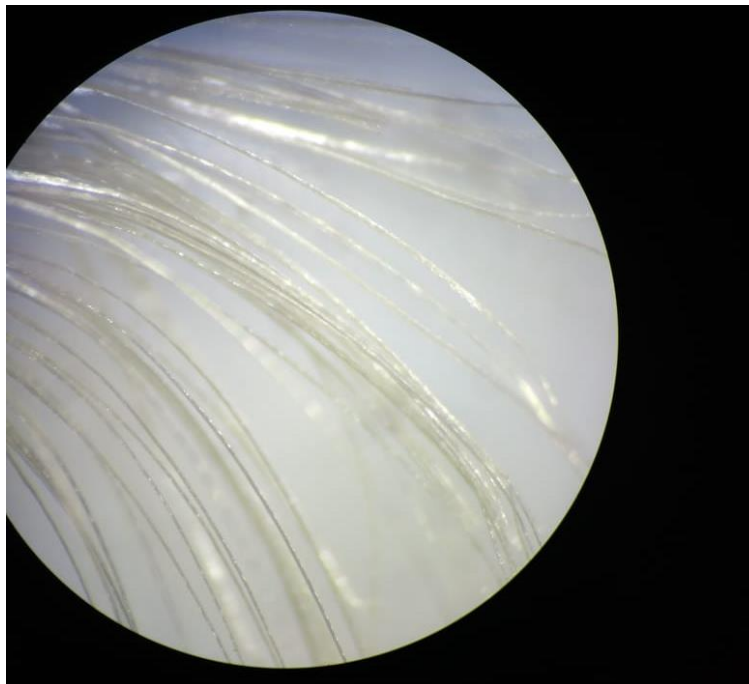


Figura 12. Fotografía de los filamentos lisos de un vilano de un ejemplar de cardo mariano bajo el microscopio.

8.2. Seguimiento del desarrollo del cultivo

La profundidad de la siembra de las semillas entre 1 y 2 centímetros no tuvo una diferencia significativa (Figura 13). El porcentaje de germinación fue del 100%.

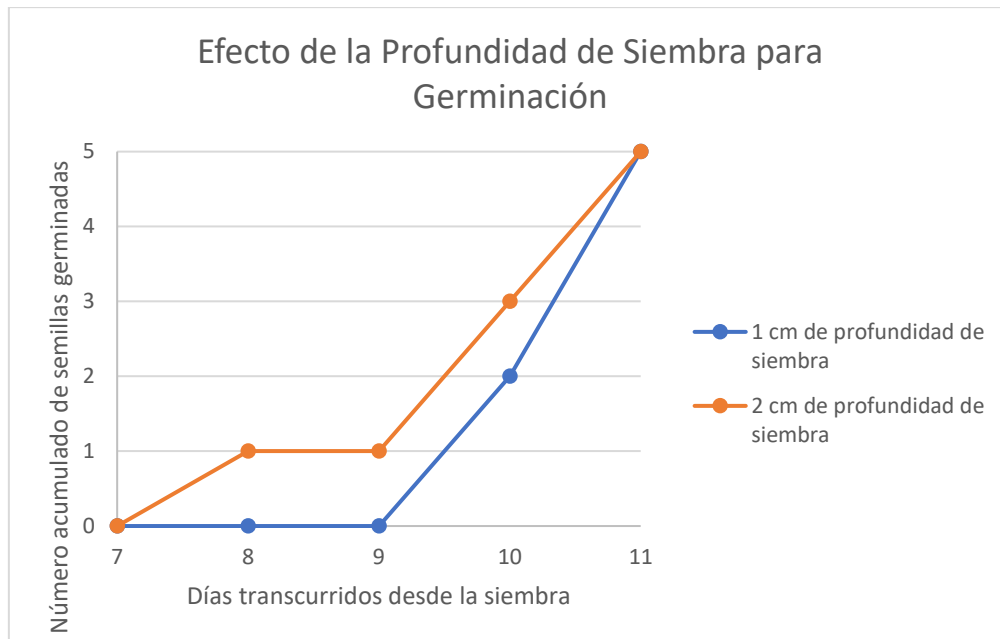


Figura 13. Gráfica del tiempo del tiempo de germinación de semillas de *Silybum marianum* según su profundidad de siembra.

Fotos del Monitoreo de las Semillas



Figura 14. Fotografía de las plantas cultivadas después de 2 semanas transcurridas desde su germinación.



Figura 15. Fotografía de las plantas cultivadas después de 12 semanas transcurridas desde su germinación.



Figura 16. Fotografía de las plantas cultivadas después de 31 semanas transcurridas desde su germinación.



Figura 17. Fotografía de las plantas cultivadas después de 31 semanas transcurridas desde su germinación.

El crecimiento vegetativo se registró del día 0 al día 206. Transcurridos 206 días comenzó el desarrollo reproductivo que duró hasta el día 360 en el que comenzaron a morir las plantas. El diámetro de la roseta de las plantas alcanzó un diámetro de 175 centímetros en promedio. Se descartó del promedio la planta número 1 ya que tuvo que ser trasplantada y esto le afectó en su crecimiento y desarrollo (Figura 18).

Las plantas cultivadas bajo el sol directo registraron un crecimiento vegetativo del diámetro de su roseta en promedio de 181 centímetros, mientras que las que fueron cultivadas bajo la sombra registraron un crecimiento menor de 156 centímetros (Figuras 19 y 20).

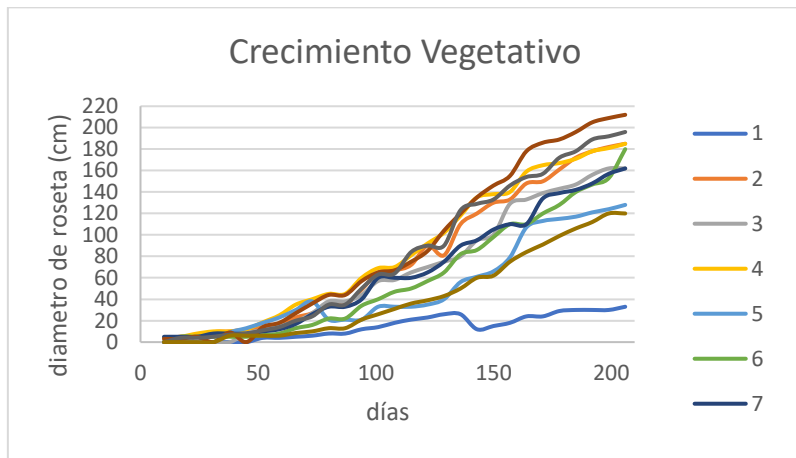


Figura 18. Gráfica del ritmo del crecimiento vegetativo de las plantas según el diámetro de su roseta.

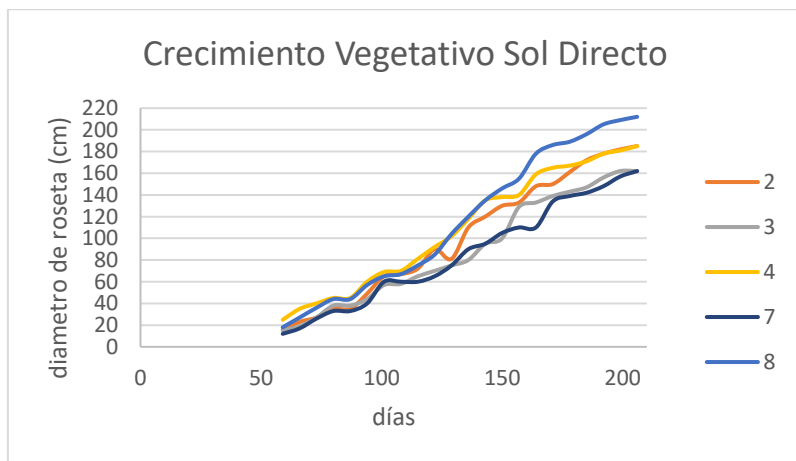


Figura 19. Gráfica del ritmo del crecimiento vegetativo de las plantas de *Silybum marianum* expuestas al sol directo según el diámetro de su roseta.

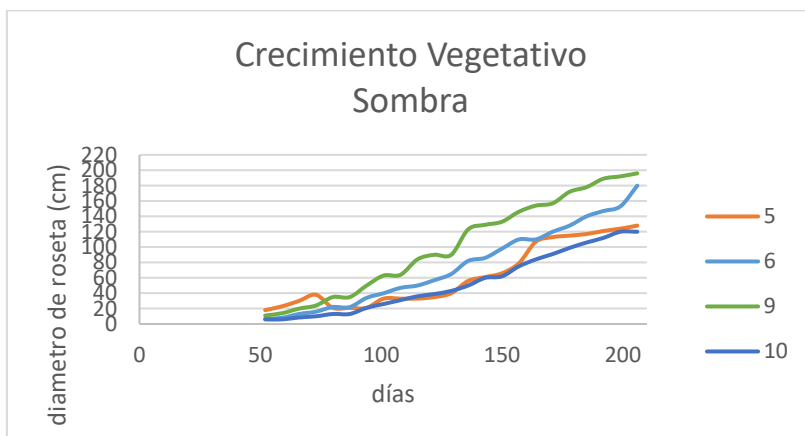


Figura 20. Gráfica del ritmo del crecimiento vegetativo de las plantas de *Silybum marianum* bajo la sombra según el diámetro de su roseta.

Las plantas cultivadas bajo el sol directo registraron un número de flores por planta en promedio de 90 flores, mientras que las que fueron cultivadas bajo la sombra registraron un número menor de 10.7 flores por planta (Figuras 21 y 22).

Se registraron 147 semillas por flor en promedio. Este dato fue indistinto en cuanto a si fueron cultivadas bajo el sol directo o la sombra.

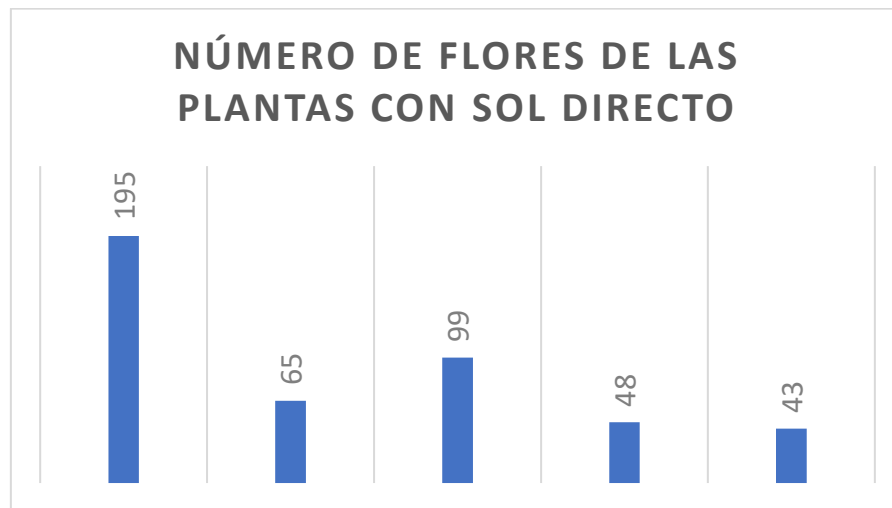


Figura 21. Gráfica del número de flores por planta de *Silybum marianum* con exposición al sol directo.

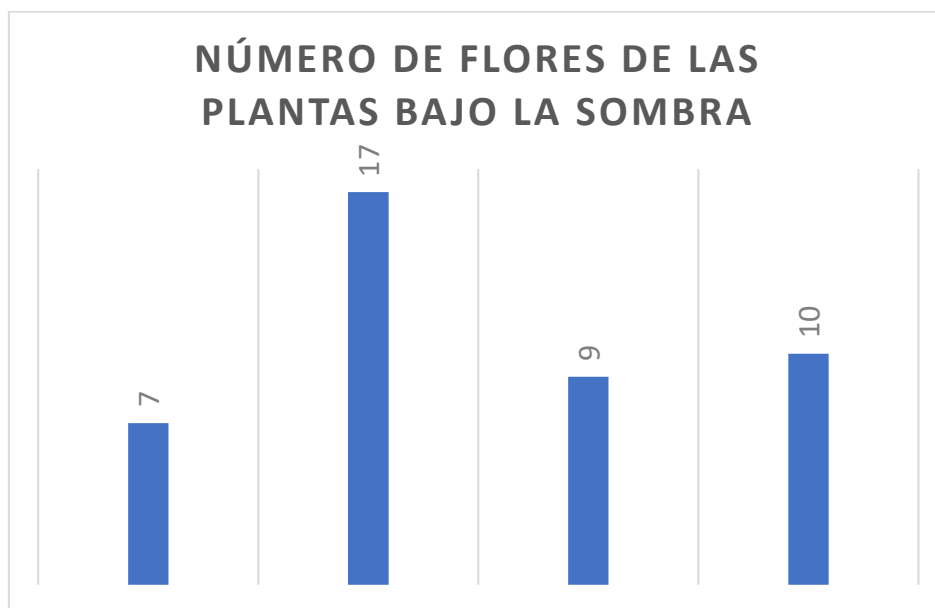


Figura 22. Gráfica del número de flores por planta de *Silybum marianum* bajo la sombra.

8.3. Caracterización de semillas y extracción del aceite de las semillas de *Silybum marianum*

Para la caracterización de las semillas se determinó que el peso unitario promedio por semilla fue de 0.04 g. El porcentaje de humedad de las semillas fue de 1.8% (Tablas 6).

El porcentaje de aceite en semillas fue de 23% (± 0.0103), lo que va de acuerdo con lo reportado por El-Mallah en 2003 en Egipto (Tabla 6). Otros autores como Takase (2014) en China señalan un 46% del contenido de aceite.

Algunos estudios han demostrado que, dependiendo de la variedad de las semillas y sus condiciones de cultivo, algunas características como la cantidad de aceite pueden variar. Por ejemplo, Fathi-Achachlouei y Azadmard-Damirchi en 2009 demostraron una variación del porcentaje de aceite desde el 26% al 31% en cuatro diferentes variedades provenientes de distintos países.

Para evaluar si el factor que determina la variación en el contenido de aceite es la variedad de la que se obtienen las semillas, las condiciones de cultivo o alguno otro, se requiere un estudio más específico. Sin embargo, el dato obtenido en el presente estudio nos demuestra el potencial de estas semillas cultivadas a cielo abierto en la Ciudad de México para la producción de biodiésel.

Tabla 6. Caracterización del peso, porcentaje de aceite y de humedad de las muestras de semillas de *Silybum marianum*.

Muestra	Peso total (g)	Promedio peso semilla (g)	# aproximado de semillas	Peso seco total (g)	% de humedad	Cantidad de Aceite (g)	% de aceite
Sh1	32	0.03	928	31.45	1.7%	7.16	23%
Sh2	32	0.04	864	31.5	1.6%	7.7	25%
Sh3	32	0.04	870	31.36	2.0%	7.3	23%
Sh4	32	0.04	909	31.38	1.9%	6.8	22%
Sh5	32	0.04	896	31.46	1.7%	7.1	23%
Sh6	32	0.03	917	31.42	1.8%	6.9	22%
Promedio	32	0.04	897	31.43	1.8%	7.2	23%

8.4. Determinación del porcentaje de ácidos grasos libres

Del lado derecho de la foto de la figura 23 podemos observar el estándar de ácido oleico el cual representa el porcentaje de ácidos del 100%. La altura a la que se observa su mayor concentración es la que representa a los ácidos grasos libres. Podemos observar que el resto de las muestras de la figura 23, las cuales representan al aceite con exposición a la

temperatura ambiental por periodos prolongados, contienen alrededor de un 10% de ácidos grasos libres.

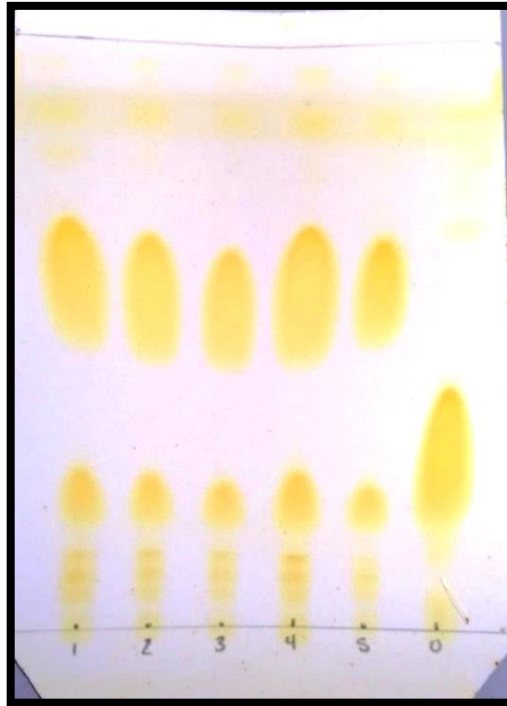


Figura 23. Fotografía de la TLC del aceite extraído de semillas de *Silybum marianum* con exposición a la temperatura ambiental por periodos prolongados y su comparación con un estándar de ácido oleico.

En la siguiente figura podemos observar la TLC de los aceites conservados en ultracongelación. Los cuales muestran tener un porcentaje de acides menor al de los aceites que fueron expuestos a temperaturas ambientales. Se observa un porcentaje de acides de alrededor de 3-4%.

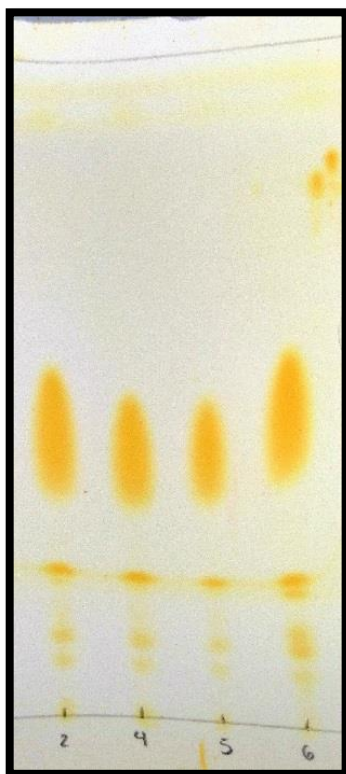


Figura 24. Fotografía de la TLC del aceite extraído de semillas de *Silybum marianum* conservado en ultracongelación.

El porcentaje de ácidos grasos libres de las muestras de aceite de las semillas de cardo mariano con exposición a la temperatura ambiental por periodos prolongados resultó ser de 7.64% (± 0.0035).

Tabla 7. Cálculo del porcentaje de acidez por medio de la metodología de Kwon & Rhee del aceite extraído de semillas de *Silybum marianum* con exposición a la temperatura ambiental por periodos prolongados.

690nm	mM (dilución 1:60)	mM	[ácidos grasos] (g/ml)	%Acidez del Aceite
0.56	4.23	254.02	0.072	7.95%
0.496	3.75	224.89	0.064	7.04%
0.538	4.07	244.01	0.069	7.64%
0.544	4.11	246.74	0.070	7.73%
0.552	4.17	250.38	0.071	7.84%
			promedio	7.64%
			desv est	0.0035
			% cv	5%

El porcentaje de ácidos grasos libres de las muestras de aceite de las semillas de cardo mariano conservado en ultracongelación resultó ser de 3.79% (± 0.0006). Esto demuestra que el aceite de las semillas de *Silybum marianum* sufre una degradación si no es almacenado correctamente.

Tabla 8. Cálculo del porcentaje de acidez por medio de la metodología de Kwon & Rhee del aceite extraído de semillas de *Silybum marianum* conservado en ultracongelación.

690nm	mM (dilución 1:30)	mM	[ácidos grasos] (g/ml)	%Acidez del Aceite
0.533	4.03	120.86	0.034	3.78%
0.526	3.98	119.27	0.034	3.73%
0.543	4.10	123.14	0.035	3.86%
promedio				3.79%
desv est				0.0006
% cv				2%

El porcentaje de acidez del biodiésel después del lavado fue de 0.6% (± 0.0035), lo que indica que se logró una adecuada purificación de los ésteres etílicos después del lavado.

8.5. Síntesis de biodiesel a partir del aceite de *Silybum marianum*

Se utilizó la vía química alcalina para la transesterificación debido al bajo porcentaje de acidez del aceite (Gerpen, 2005).

El tiempo de completación de la reacción de transesterificación fue de 15 minutos (Figura 25)

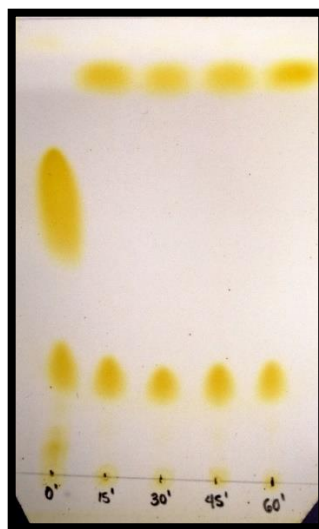


Figura 25. Fotografía de la TLC del avance de la reacción de transesterificación del aceite extraído de semillas de *Silybum marianum* en el tiempo inicial y después de 15, 30, 45 y 60 minutos.

El rendimiento de recuperación fue del 82% (± 0.0167). En el estudio de Takase en 2014 se realizó un experimento con condiciones de transesterificación similares y reportaron un rendimiento del 92.32%. Los autores partieron de un aceite con menor porcentaje de ácidos grasos libres (0.68%), razón probable por la cual obtuvieron un mayor rendimiento. Esto se debe a que los ácidos grasos libres del aceite no se pueden transesterificar por la vía alcalina en un paso, se separan del biodiésel al realizar el lavado y se pierde esa porción del aceite (Dorado et al., 2004)

Tabla 9. Cálculo del rendimiento de la reacción de transesterificación del aceite de extraído de semillas de *Silybum marianum* conservado en ultracongelación.

Rendimiento Reacción de Transesterificación			
Muestra	Volumen inicial de Aceite (ml)	Volumen recuperado de Biodiésel (ml)	Rendimiento (%)
1	6	5	83%
2	6	4.9	82%
3	3	2.4	80%
promedio			82%
desv est			0.0167
% cv			2%

8.6. Determinación de la densidad

La densidad obtenida fue de 0.9021 g/ml para el aceite de semillas de *Silybum marianum* y 0.8769 g/ml para el biodiésel.

La densidad del biodiésel debe estar dentro del intervalo de 0.89 y 0.86 g/ml según los estándares internacionales de ASTM D6751 en Estados Unidos. La mayor parte de los estándares internacionales se encuentran en este intervalo. 21

Por lo que la densidad del biodiésel obtenido en este trabajo se encuentra dentro del intervalo especificado en los estándares.

Tabla 10. Comparación de la densidad del aceite y del biodiésel de las muestras de semillas de *Silybum marianum*.

Densidad (g/ml)	
Aceite <i>Silybum marianum</i>	Biodiésel <i>Silybum marianum</i>
0.9021	0.8517

8.7. Extracción de silimarina de las semillas y análisis por HPLC de la silimarina extraída

Se identificaron tentativamente 6 picos tanto en el estándar de silimarina como en las muestras. Los picos de los cromatogramas del estándar de silimarina y de las muestras resultaron ser prácticamente idénticos (Figura 26 y 27), y se compararon con los cromatogramas del trabajo de Wianowska y Wisniewski (2014). Estos picos tentativamente representan a los compuestos que conforman a la silimarina. Se identificaron como silicristina, silidanina, silibinina A y B, e isosilibinina A y B. Para identificarlos certeramente es necesario realizar un análisis de HPLC acoplado a masas.

Los porcentajes de los componentes de la silimarina fueron calculados comparando el área de cada uno de sus picos entre el área total. La silicristina representa un 13%, la silidanina 16%, la silibinina A 36%, silibinina B 24%, Isosilibinina A 9% e isosilibinina B 2%. En total se obtuvieron 229.69 microgramos de silimarina por gramo de extracto etanólico y 9.6 miligramos de silimarina por gramo de semilla (Tablas 12 y 13).

Se identificaron dos picos en los cromatogramas del estándar de la isosilibina tentativamente correspondientes a la isosilibina A y B. Los tiempos de retención concuerdan con los del estándar de silimarina y las muestras (Figura 28).

Tabla 11. Cálculo de los miligramos de silimarina por gramo de semilla de *Silybum marianum* cultivada en México. *El dato se calcula en la tabla 13.

Muestra de semillas total	Peso extracto etanólico (g)	mg silimarina /g extracto	mg silimarina/ g semilla
32	1.34	229.69*	9.6

Tabla 12. Identificación de los picos encontrados en los cromatogramas del análisis por HPLC de los extractos de las semillas de *Silybum marianum* cultivado. Cuantificación de microgramos de compuestos de interés por gramo de extracto etanólico.

Identificación tentativa	Tiempo de Retención (min)	% del Área	ug /mg extracto
Silicristina	7.19	13%	25.01
Silidianina	7.8	16%	61.69
Silibinina A	15.27	36%	64.94
Silibinina B	16.09	24%	48.26
Isosilibinina A	18.86	9%	24.72
Isosilibinina B	19.37	2%	5.07
Silimarina total	-	100%	229.69

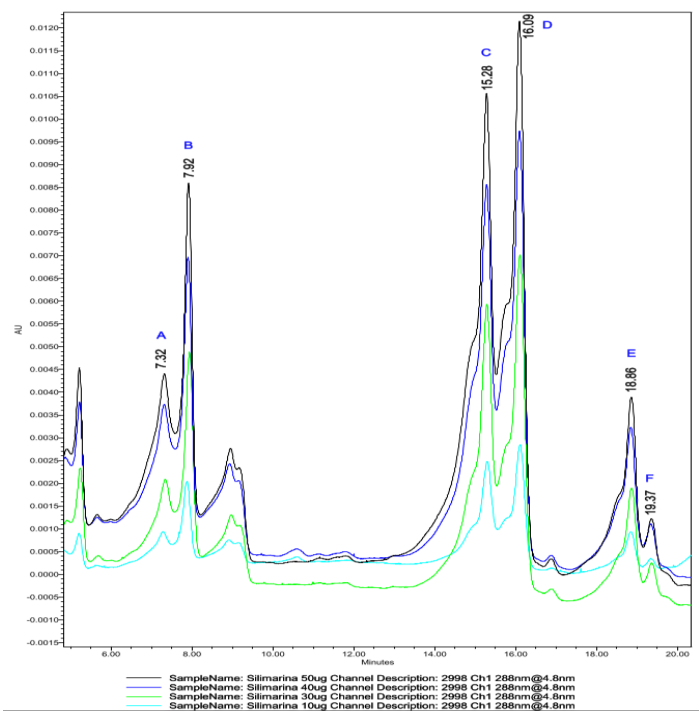


Figura 26. Cromatograma de la curva a distintas concentraciones del estándar de silimarina. Picos: (A) Silicristina, (B) Silidianina, (C) Silibinina A, (D) Silibinina B, (E) Isosilibinina A, (F) Isosilibinina B.

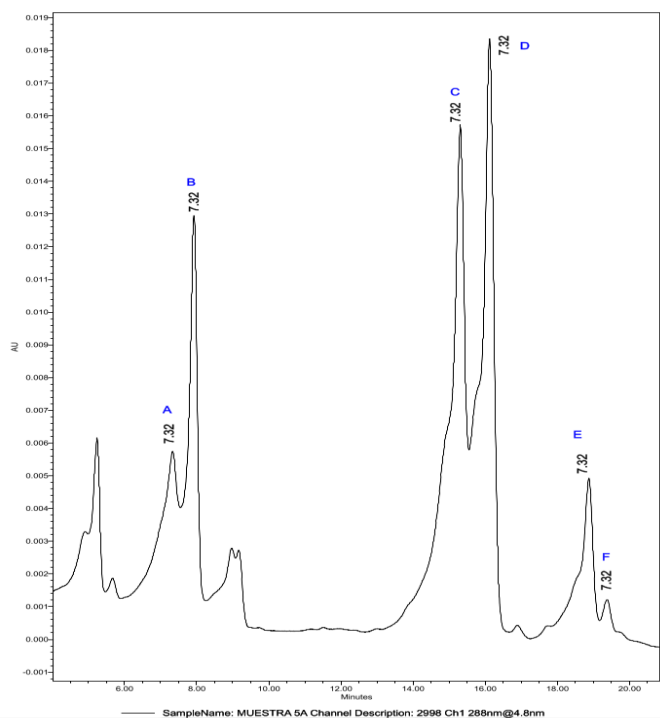


Figura 27. Cromatograma de una de las muestras de los extractos etanólicos de las semillas de las plantas cultivadas de *Silybum marianum*. Picos: (A) Silicristina, (B) Silidianina, (C) Silibinina A, (D) Silibinina B, (E) Isosilibinina A, (F) Isosilibinina B.

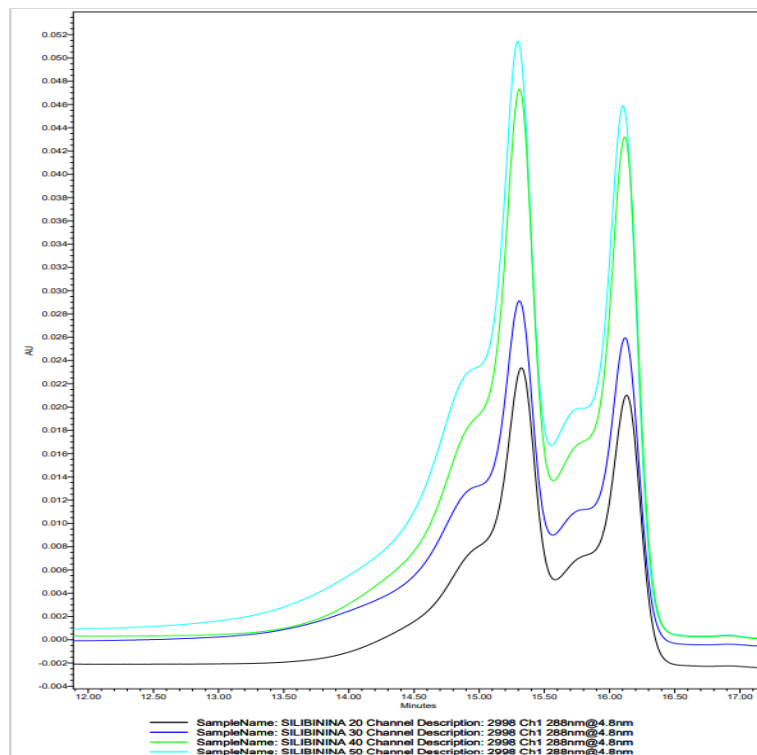


Figura 27. Cromatograma del estándar de silibinina. Picos: silibinina A y B, respectivamente.

8.8. Cálculo de Rendimientos

Con base en los cálculos realizados se requieren aproximadamente 9 plantas de cardo mariano para producir 1 litro de biodiésel (Tabla 13). Este dato nos indica cuantas plantas tendríamos que plantar para tener cierta producción deseada.

De acuerdo con estos mismos cálculos (Tabla 13) se podrían producir 2,777.7 litros de biodiesel en una hectárea de terreno cultivado utilizando el acomodo que se utilizó en este cultivo. Esto equivale a 69.44 tanques de un automóvil convencional. En esta misma área se pueden producir potencialmente 127,008 gramos de silimarina, los cuales resultan en un potencial económico de aproximadamente \$291,059 pesos mexicanos por hectárea (tomando como referencia los precios del mercado al momento de publicar este trabajo).

Este cálculo incluso se podría extender para calcular los costos de producción, ganancias aproximadas y determinar la viabilidad económica del proceso.

Variando las condiciones del cultivo, el acomodo de las plantas (incluso se podría pensar en un acomodo de agricultura vertical), optimizando la extracción del aceite de las semillas y la transesterificación, el porcentaje de ácidos grasos libres, el número de semillas, flores, etc. Se

podría reducir el número de plantas requeridas para aumentar el potencial del aceite de las semillas de cardo mariano para la producción de biodiésel.

Tabla 13. Cálculo del número de plantas requeridas para producir 1 litro de biodiésel.

Volumen de biodiésel deseado	Volumen de Biodiésel (ml)	Rendimiento de recuperación de la Transesterificación	Volumen de aceite requerido (ml)	Porcentaje de aceite de las semillas	Densidad del aceite (g/ml)	Aceite requerido (g)
1 L biodiesel	1,000.00	82%	1,219.51	23%	0.9021	1,100
Semillas requeridas (g)	Peso semilla aprox (g)	Número de semillas requeridas	Semillas x flor	Flores x planta	Número de flores requeridas	Número de plantas requeridas
4,783	0.04	119,578	147	90	813	9.0

Plantas/ha	Número de plantas requeridas/ L biodiésel	L biodiésel/ha	Tanques de auto/ha
25,000	9.0	2,777.77	69.44

Semillas/flor (g)	Peso semilla aprox (g)	g semilla/ flor	Flores x planta	g semilla/ planta	mg silimarina/ g semilla	mg silimarina/ planta	g silimarina/ ha	Pesos mexicanos/ ha *
147	0.04	5.88	90	529.2	9.6	5,080.32	127,008	\$291,059

*Tomando en cuenta precios de referencia del mercado, sin tomar en cuenta costos de producción y comercialización

9. CONCLUSIONES

Se analizó el potencial para la producción de biodiesel del aceite obtenido a partir de semillas de cardo mariano cultivado a cielo abierto en Cuajimalpa, Ciudad de México.

En cuanto a los aceites y el biodiésel producido, las semillas contienen un porcentaje de aceite del 23% y un bajo porcentaje de ácidos grasos libres permitiendo efectuar la transesterificación alcalina en un paso. Ambos factores acordes a lo reportado en otras investigaciones. El

rendimiento recuperación se considera dentro de los rangos reportados en la literatura (82.33%). Con la finalidad de aumentar el rendimiento de la transesterificación, se debe explorar las condiciones de reacción. El tiempo necesario para efectuar la reacción de transesterificación fue de 15 minutos, lo que ahorra tiempo y costos. La densidad del biodiésel obtenido se encuentra dentro del rango de los estándares del ASTM D6751. Sería interesante probar métodos de transesterificación con enzimas que son considerados más amigables para el medio ambiente.

En cuanto al cultivo de la planta, el número de flores y de semillas resultó ser similar, aunque menor al reportado en la literatura. La literatura reporta 100 flores por planta, nuestras plantas bajo sol directo produjeron 90 flores en promedio. Según la literatura se producen en promedio 200 semillas por flor, nuestras plantas produjeron 147 semillas por flor en promedio (INAFED, s.f.). Uno de los factores que restringen su potencial es el tiempo que requiere su desarrollo, la planta requiere de prácticamente un año para culminar su ciclo y comienza a producir semillas maduras hasta los 260 días de su germinación. El cardo mariano es una planta con fotoperiodicidad de día largo, lo que significa que florece al ser estimulada por los días largos de verano en el hemisferio norte. Un punto interesante sería probar si se puede estimular su floración por medio de fotoinducción para acelerar la producción de flores y semillas.

La cantidad de silimarina en los extractos fue de 9.6 mg/g de semilla. Se encuentra en una cantidad similar, aunque un poco menor a los 10 mg/g reportados (Hevia et al., 2007; Wianowska & Wisniewski, 2015).

Finalmente, se calculó que teóricamente se requieren 9 plantas de cardo mariano cultivado en México para producir 1 litro de biodiésel a partir del aceite de sus semillas. Las características del aceite y del biodiésel demostraron tener un potencial favorable. Sin embargo, aún se pueden optimizar las condiciones del cultivo, de la extracción del aceite y la silimarina de las semillas, y la transesterificación para mejorar los rendimientos del aceite, biodiésel, producción de flores, semillas, etcétera.

Este proceso podría ser usado para empresas/poblaciones/personas que ya producen silimarina y deseen utilizar el aceite como una fuente energética alternativa a los combustibles fósiles. Se requieren demasiadas plantas y tiempo como para pensar en una producción a gran escala con el objetivo de producción de biodiésel como objetivo principal.

10. REFERENCIAS CITADAS

- AbouZid, S. F., Ahmed, H. S., Moawad, A. S., Owis, A. I., Chen, S., Nachtergaeel, A., McAlpine, J. B., Friesen, J. B., Pauli, G. F. (2017). Chemotaxonomic and biosynthetic relationships between flavonolignans produced by *Silybum marianum* populations. *Fitoterapia*, 199: 175-184. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.04.002
- Ahmad, M., Zafar, M., Sultana, S., Azam, A., Khan, M. A. (2013). The Optimization of Biodiesel Production from a Novel Source of Wild Non-Edible Oil Yielding Plant *Silybum Marianum*. *International Journal of Green Energy*, 11:6, 589-594. <http://dx.doi.org/10.1080/15435075.2013.777910>
- Armstrong, A. J., & Hamrin, D. J. (2000). The Renewable Energy Policy Manual. U.S. Export Council for Renewable Energy. <http://www.oas.org/dsd/publications/unit/oea79e/ch05.htm>
- Atabani, A., Silitonga, A., Badruddin, I. A., Mahlia, T., Masjuki, H., & Mekhilef, S. (2012). A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy source and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2070-2093. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.003>
- Barabás, I., Todorut, I., (2011). Biodiesel Quality, Standards and Properties. *Emissions and By-Products*, Montero, G. (Ed.), ISBN: 978-953-307-784-0, InTech. <http://www.intechopen.com/books/biodiesel-quality-emissions-and-by-products/biodiesel-qualitystandards-and-properties>
- Bokor, L. (2013). The Energy Resources and Their Importance in the Local Environment. Research Gate. *Geographical Locality Studies*, 1, 14-29. https://www.researchgate.net/publication/315016226_The_Energy_Resources_and_Their_Importance_in_the_Local_Environment
- BP. (2017). BP Statistical Review of World Energy June 2017 (Edición Nr. 66). <https://www.bp.com/content/dam/bp/en/corporate/pdf/energy-economics/statistical-review-2017/bp-statistical-review-of-world-energy-2017-full-report.pdf>
- Cai, X.-L & Li, D.-N & Qiao, J.-Q & Lian, H.-Z & Wang, S.-K. (2009). Determination of Silymarin Flavonoids by HPLC and LC-MS and Investigation of Extraction Rate of Silymarin in *Silybum marianum* Fruits by Boiling Water. *Asian Journal of Chemistry*. 21. 63-74.
- Cosío-Cuadros, R., Armendáriz-Ruiz, M. A., Páez-Hernández, G., Espinosa-Andrews, H., Rodríguez-González, J. A., Mateos-Díaz, J. C. (2019) *Síntesis Enzimática de Biolubricantes a Partir de Aceite de Higuera* [cartel]. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, León, Guanajuato, México.
- Cumplido, I. (1849) *El Álbum Mexicano. Periódico de literatura, artes y bellas letras*. <https://archive.org/details/elalbummexicano01cump/page/n243/mode/2up/search/cardo>
- Da Tech, R. (2012). Acid Number to FFA Conversions. Make Biodiesel. <http://www.make-biodiesel.org/Biodiesel-Chemistry/acid-number-to-ffa-conversions.html>
- Demirbas, A. (2008). Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-84628-995-8>

- Dictionary.com. (s.f.). saturated fatty acid. Consultado el 15 de abril de 2020.
<https://www.dictionary.com/browse/saturated-fatty-acid>
- Ellabban, O., Abu-Rub, H., & Blaabjerg, F. (2014). Renewable energy resources: Current status, future prospects and their enabling technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 748-764: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.113>
- El-Mallah, H. (2003). Detailed studies on some lipids of *Silybum marianum* seed oil. *Grasas y Aceites*, 54 (4), 396-402. <https://doi.org/10.3989/gya.2003.v54.i4.227>
- Elwekeel, A. E. (2013). Silymarin content in *Silybum marianum* fruits at different maturity stages. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (23), 1665-1669.
https://academicjournals.org/article/article1380787256_Elwekeel%20et%20al.pdf
- Fadhil, A. B., Ahmed, K. M., Dheyab, M. M. (2012). *Silybum marianum* L. seed oil: A novel feedstock for biodiesel production. *Arabian Journal of Chemistry*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.11.009>
- Fadhil, A. B., Aziz, A. M., Al-Tamer, M. H. (2015). Biodiesel production from *Silybum marianum* L. seed oil with high FFA content using sulfonated carbon catalyst for esterification and base catalyst for transesterification. *Science Direct. Energy Conversion and Management* 108 (2016). 225-265. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.11.013>
- Falco, M. d., & Mastrandrea, N. (2014). An Analytical Model for Optimizing the Combination of Energy Sources in a Single Power Transmission Network. *Hindawi. Journal of Renewable Energy*, 10 p. <https://doi.org/10.1155/2014/143736>
- Fathi-Achachlouei, B., Azadmard-Damirchi, S. 2009. Milk Thistle Seed Oil Constituents from Different Varieties Grown in Iran. *J Am Oil Chem Soc* 86:643–649.
<https://doi.org/10.1007/s11746-009-1399-y>
- Feofilova, E.P., Sergeeva, Y.E. & Ivashchkin. (2010). A.A. Biodiesel-fuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology (Review). *Appl Biochem Microbiol* 46, 369–378 (2010). <https://doi.org/10.1134/S0003683810040010>
- Flora, Kenneth MD*; Hahn, Martin MD; Rosen, Hugo MD; Benner, Kent MD Milk Thistle (*Silybum marianum*) for the Therapy of Liver Disease, *American Journal of Gastroenterology*: February 1998 - Volume 93 - Issue 2 - p 139-143
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. (2001) Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (5), 405-416.
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80288-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80288-7)
- Gerpen, Jon. (2005). Biodiesel processing and production. *Fuel Proc. Technol.* 86: 1097-1107. *Fuel Processing Technology.* 86. 1097–1107. [10.1016/j.fuproc.2004.11.005](https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2004.11.005).
- Graham, R. B. (2014). Lipids and disorders of lipoprotein metabolism. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects (Third Edition)*. 702-736.
<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/triglyceride> .
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5140-1.00037-7>

- Hammouda, S. I. (1993). Evaluation of the Silymarin Content in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Cultivated under Different Agricultural Conditions. *Phytotherapy Research*, 7 (1), 90-91. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650070122>
- Hevia, F., Wilckens, R. L., Berti, M. T., Fischer, S. U. (2007) Calidad de Cardo Mariano (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) Cosechado en Diferentes Estados Fenológicos. *Información Tecnológica* Vol. 18(5). 69-74. https://www.researchgate.net/publication/242296258_Calidad_de_Cardo_Mariano_Silybum_marianum_L_Gaertn_Cosechado_en_Diferentes_Estados_Fenologicos
- INAFED. Cuajimalpa de Morelos. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de Mexico. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM09DF/delegaciones/09004a.html>
- International Energy Agency. (2017). World Energy Outlook 2017. Consultado el 10 de marzo de 2020. <https://www.iea.org/weo2017/>
- IPCC. (2021). Global Warming of 1.5 °C. Consultado el 10 de julio de 2021. <https://www.ipcc.ch/sr15/>
- IUPAC. (2014). Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Consultado el 15 de abril de 2020. <http://goldbook.iupac.org/terms/view/F02330>
- IUPAC. (2014). Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Consultado el 15 de abril de 2020. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/E02219>
- Kvasnicka, F., Bíba, B., Sevcik, R., Voldrich, M., Kratka, J. (2003). Analysis of active components of silymarin. *Journal of Chromatography A*. 990, 1-2, 239-245. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01971-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01971-4)
- Kwoon, D. Y., Rhee, J. S. (1986). A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 63, 89-92. <https://doi.org/10.1007/BF02676129>
- Legaz Berbel, R. (2010). Estudio de la viscosidad y densidad de diferentes aceites para su uso como biocombustible. *Escola d'Enginyeria d'Igualada - E. T. Industrial, especialitat en Química Industrial [39]*. <http://hdl.handle.net/2099.1/9403>
- Lim, J. H. (2012). Optimal Combination and Sizing of a New and Renewable Hybrid Generation System. *International Journal of Future Generation Communication and Networking*, 5. https://www.researchgate.net/publication/284286532_Optimal_combination_and_sizing_of_a_new_and_renewable_hybrid_generation_system
- Lipids. (05 de mayo de 2020). En Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Lipid>
- Lynwood, B. (1969). Rudolf Diesel and His Rational Engine. *Scientific American*. 221 (2), 108-117. <https://www.jstor.org/stable/24926442>
- Malça, J., Freire, F., (2011). Life-cycle studies of biodiesel in Europe: A review addressing the variability of results and modeling issues. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 338-351. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.013>.

- Martin, D. L. (2006). Factors influencing silymarin content and composition in variegated thistle. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 34 (3), 239-245. <https://doi.org/10.1080/01140671.2006.9514413>
- Meher, L. C., Vidya Sagar, D., Naik, S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10(3), 248-268. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>.
- Mollenhauer, K., Tschöke, H. (2010). *Handbook of Diesel Engines*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-540-89083-6
- Nelson, K. (2009). ASTM Establece las Normas para el Biodiésel. ASTM International. Consultado el 5 de mayo de 2020. https://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPJF09/nelson_spjf09.html
- Otera, J. (1993). Transesterification. *Chemical Reviews*. Chem. Rev. 1993. 93, 4, 1449-1470. <https://doi.org/10.1021/cr00020a004>
- Pacific Biodiesel. (2016). Frequently Asked Questions. Consultado el 10 de marzo de 2020. <http://www.biodiesel.com/biodiesel/faq/>
- Paula R. Davis-Searles, Yuka Nakanishi, Nam-Cheol Kim, Tyler N. Graf, Nicholas H. Oberlies, Mansukh C. Wani, Monroe E. Wall, Rajesh Agarwal and David J. Kroll. Milk Thistle and Prostate Cancer: Differential Effects of Pure Flavonolignans from *Silybum marianum* on Antiproliferative End Points in Human Prostate Carcinoma Cells. *Cancer Res* May 15 2005 (65) (10) 4448-4457; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4662
- Ramawat, K. G., Mérillon, J. M. (2008). *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*. Springer Science & Business Media. https://play.google.com/store/books/details?id=rchJAAAAQBAJ&rdid=book-rchJAAAAQBAJ&rdot=1&source=gbs_vpt_read&pcampaignid=books_booksearch_viewport
- Real Academia Española. (2019). Diccionario de la lengua española (edición del tricentenario). <https://dle.rae.es/rendimiento>
- Real Academia Española. (2019). Diccionario de la lengua española (edición del tricentenario). <https://dle.rae.es/vilano>
- Rodriguez, D. J.-P. (2020). Transportation and Energy. *The Geography of Transport Systems*. https://transportgeography.org/?page_id=15592
- Sebley, C., Cymet, T. (2016) Saturated Fat. *Britannica*. <https://www.britannica.com/science/saturated-fat>
- Secretaría de Economía de México. (2012). *NMX-F-075-SCFI-2012, Alimentos- Aceites y grasas vegetales o animales determinación de la densidad relativa- método de prueba*. Diario Oficial de la Federación. <http://aniame.com/mx/wp-content/uploads/Normatividad/CTNNIAGS/NMX-F-075-SCFI-2012.pdf>

- SENER. (2016). Balance Nacional de Energía. Consultado el 10 de marzo de 2020.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/288692/Balance_Nacional_de_Energ_a_2016__2_.pdf
- Sharma, D. K. (2006). Pharmacological properties of flavonoids including flavolignans-integration of petrocrops with drug development from plants. *Journal of Scientific and Industrial Research*. Sharma, Durlubh. (2006). Pharmacological properties of flavonoids including flavonolignans-Integration of petrocrops with drug development from plants. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 65. 477-484.
- Shu Yun Zhu, Y. D. (2014). *Silybum marianum* oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose. Zhu SY, Dong Y, Tu J, Zhou Y, Zhou XH, Xu B. *Silybum marianum* oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose. *Pharmacogn Mag*. 2014 Jan;10(Suppl 1):S92-9. doi: 10.4103/0973-1296.127353
- Takase, M., Feng, W., Wang, W., Gu, X., Zhu, Y., Li, T., Yang, L., Wu, X. (2014) *Silybum marianum* oil as a new potential non-edible feedstock for biodiesel: A comparison of its production using conventional and ultrasonic assisted method. *Fuel Processing Technology*. 123 (2014) 19-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.01.032>
- Takase, M., Nii Moi Pappoe, A., Amankwa Afrifa, E., Miyittah, M. (2018). High performance heterogeneous catalyst for biodiesel production from non-edible oil. *Renewable Energy Focus*, 25, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.ref.2018.03.002>
- Thompson, T. E. (2020). Lipid. *Britannica*. <https://www.britannica.com/science/lipid>
- United Nations Foundation. (2017). What we do: Energy and Climate. Consultado el 10 de marzo de 2020. <http://www.unfoundation.org/what-we-do/issues/energy-and-climate/>
- Villalpando Laurean, A. (2019). *Enriquecimiento de ácidos grasos poliinsaturados y co-producción de biodiésel a partir de aceite de pescado mediante tecnología quimioenzimática y destilación molecular* [tesis de maestría, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.].
- Vitz, E., Moore, J. W., Shorb, J., Prat-Resina, X., Wendorff, T., Hahn, A. (2020). Foods: Acid Value and the Quality of Fats and Oils. *Chemistry-LibreTexts*. Consultado el 10 de marzo de 2020.
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_ChemPRIME_\(Moore_et_al.\)/14Ionic_Equilibria_in_Aqueous_Solutions/14.09%3A_Titration_Curves/Foods%3A_Acid_Value_and_the_Quality_of_Fats_and_Oils](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_ChemPRIME_(Moore_et_al.)/14Ionic_Equilibria_in_Aqueous_Solutions/14.09%3A_Titration_Curves/Foods%3A_Acid_Value_and_the_Quality_of_Fats_and_Oils)
- Wianowska, D., Wisniewski, M. (2015). Simplified Procedure of Silymarin Extraction from *Silybum marianum* L. Gaertner. *Journal of Chromatographic Science* (53) 2, 366-372.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu049>
- Wiesman, Z. (2009). *Desert Olive Oil Cultivation*. Academic Press. 257-302.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374257-5.00011-7>
- Wood, D. (2015). Carbon-Neutral Activity & Biofuel. *Study.com*. Consultado el 14 de abril del 2020. <https://study.com/academy/lesson/carbon-neutral-activity-biofuel.html>

