

**ESTUDIO DEL MÉTODO DE PRETRATAMIENTO QUÍMICO ETANOL-NaOH  
PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES A PARTIR DE  
MICROALGAS, COMO VÍA A LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

**MARÍA INÉS JARAMILLO GUTIÉRREZ  
NEILA MILENA MANTILLA BARBOSA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

**ESTUDIO DEL MÉTODO DE PRETRATAMIENTO QUÍMICO ETANOL-NaOH  
PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES A PARTIR DE  
MICROALGAS, COMO VÍA A LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

**MARÍA INÉS JARAMILLO GUTIÉRREZ  
NEILA MILENA MANTILLA BARBOSA**

**Trabajo presentado como requisito para optar al título de  
Ingeniero Químico**

**Director:**

**Viatcheslav Kafarov  
Ingeniero químico Dr. Sc.**

**Codirectores:**

**Laura Liliana Garzón Fuentes  
Ingeniera Química M. Sc.  
Instituto Colombiano del Petróleo ICP**

**Andrés Fernando Barajas Solano  
Biólogo.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, por su apoyo económico.
- INSTITUTO COLOMBIANO DEL PETROLEO, por su aporte en conocimiento y experiencia por medio de la Ingeniera LAURA GARZÓN FUENTES, quien nos orientó incondicionalmente durante la investigación.
- UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, por los brindarnos los conocimientos que fueron base para el desarrollo de este trabajo.
- CORPORACIÓN INSTITUTO MOSRROSQUILLO, por proveer las microalgas a trabajar
- Dr. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por su respaldo como líder del proyecto.
- ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO, por su valioso apoyo y dedicación.
- EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO, por su colaboración y orientación incondicional.
- Al personal de los laboratorios de Micología, Bioquímica, Biotecnología y Operaciones Unitarias
- A Dios, a nuestras familias y amigos, por su apoyo afectivo y ser nuestra fortaleza.

*A **Dios** quien me brindó la fortaleza para alcanzar una de las metas más importantes de mi vida.*

*A mis padres, hermanos, familiares y amigos,  
por su amor y apoyo incondicional.*

María Inés Jaramillo Gutiérrez

*A Dios,*

*A mis padres, Horacio y Zorayda por su infinito amor, comprensión, apoyo y  
confianza,*

*A mis queridas hermanas, Eгна y Alba por su compañía y consejo.*

Neila Mantilla

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	3
1.1 Microalgas .....	3
1.2 Clasificación de las microalgas.....	3
1.3 Características de las microalgas .....	4
1.3.1 Composición bioquímica .....	4
1.3.2 Pared celular .....	6
1.4 Pretratamientos .....	6
1.4.1 Pretratamientos aplicados a microalgas.....	7
1.4.2 Pretratamientos químicos.....	7
1.4.2.1 Pretratamiento Etanol-Base .....	7
1.5 Hidrólisis ácida.....	8
1.6 Reacciones durante el pretratamiento .....	9
1.7 Diseño experimental. ....	10
<b>2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	10
2.1 Materiales .....	12
2.1.1 Equipos .....	12
2.1.2 Materia prima .....	12
2.1.3 Preparación de la materia prima .....	12
2.2 Diseño experimental.....	13
2.2.1 Diseño experimental de los pretratamientos .....	13
2.2.2 Etapas del proceso.....	13
<b>3. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b> .....	14
3.1 Caracterización de la biomasa .....	14
3.2 Experimentos preliminares .....	15
3.2.1 Montaje a utilizar.....	15
3.2.2 Tiempo de pretratamiento.....	17

3.2.3 NaOH en el pretratamiento.....	17
3.2.4. Degradación de la glucosa .....	18
3.2.5. Interferencia del floculante en la medición de ART .....	19
3.2.6 Efectos en el uso de otros Catalizadores en el pretratamiento .....	20
3.2.7 Hidrólisis realizada a la biomasa para la cuantificación de azúcares residuales en el pretratamiento .....	21
3.3 Planeamiento experimental .....	22
3.3.1 Diseño central compuesto circunscrito (CCC) .....	22
3.3.2 Biomasa solubilizada en el licor .....	24
3.4 Efecto de las variables sobre el pretratamiento.....	25
3.4.1 Efecto del NaOH en el pretratamiento.....	26
3.4.2 Efecto del etanol y tiempo en el pretratamiento. ....	28
3.4. Región óptima para el pretratamiento.....	28
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>30</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>34</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Imagen bajo el microscopio de <i>Ch. Calcitrans</i> .....	5
<b>Figura 2:</b> Composición de azúcares polisacáridos de diferentes microalgas .....	6
<b>Figura 3:</b> Mecanismos de reacción de los carbohidratos.. .....	9
<b>Figura 4:</b> Diagrama de flujo de proceso. ....	11
<b>Figura 5:</b> Montajes analizados. ....	15
<b>Figura 6:</b> Efecto del tiempo en el pretratamiento en las corridas preliminares, para concentración de NaOH de 25% p/p y de etanol 50 % v/v. ....	17
<b>Figura 7:</b> Efecto del NaOH en el pretratamiento en las corridas preliminares para una concentración de etanol del 50 % y un tiempo de 180 min. ....	18
<b>Figura 8:</b> Efecto del NaOH con y sin antraquinona en la degradación de la glucosa, utilizando 50 % v/v de etanol y 120 min. ....	19
<b>Figura 9:</b> Efecto del floculante en la medición de ART. ....	20
<b>Figura 10:</b> Porcentaje de Biomasa resultante después del pretratamiento e hidrólisis para cada corrida realizada. ....	24
<b>Figura 11:</b> Gráfico pareto de los efectos estándares teniendo como variable respuesta: ART del pretratamiento. ....	25
<b>Figura 12:</b> Curvas de nivel mostrando el efecto de NaOH en el pretratamiento: a) Grafico Tiempo vs NaOH a 1,64% v/v de etanol b) Gráfico etanol vs NaOH a 90 min de reacción. ....	26
<b>Figura 13:</b> Efecto del Etanol y el tiempo en el pretratamiento: a) Grafico de superficie para etanol vs NaOH para un tiempo de 9,54 min b) Gráfico de superficie para el etanol vs NaOH a 9,54 min de reacción. ....	27
<b>Figura 14:</b> Superficie y curva de nivel de la concentración de NaOH en el pretratamiento .....	27
<b>Figura 15:</b> Reacción para la cuantificación de azúcares reductores totales. ....	41
<b>Figura 16:</b> Curva de glucosa. ....	42

<b>Figura 17:</b> a) <i>Ch. Gracilis</i> 150 ppm de floculante FeCl <sub>3</sub> macerada y sin macerar, b) <i>Ch. Calcitrans</i> 30 ppm de floculante FeCl <sub>3</sub> .	47
<b>Figura 18:</b> a) y b) Biomasa almacenada para planeamiento experimental.	47
<b>Figura 19:</b> a) y b) Licor y biomasa de pretratamiento antes autoclavar.	48
<b>Figura 20:</b> a) y b) Montaje para filtración al vacío.	49
<b>Figura 21:</b> a) Primera etapa de la hidrólisis, b) Segunda etapa de hidrólisis.	49
<b>Figura 22:</b> a) y b) Neutralización de licor de hidrólisis con CaCO <sub>3</sub> .	49
<b>Figura 23:</b> a) y b) Método DNS para cuantificación de ART.	50
<b>Figura 24:</b> a) y b) Cenizas de la microalga <i>Ch. calcitrans</i> .	50
<b>Figura 25:</b> a),b) Montaje soxhlet para la extracción de lípidos en la muestra	50
<b>Figura 26:</b> Tiempo 9.545 min, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	51
<b>Figura 27:</b> Tiempo 30 min, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	51
<b>Figura 28:</b> Tiempo 60 min, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	51
<b>Figura 29:</b> Tiempo 90 min, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	52
<b>Figura 30:</b> Tiempo 110 min, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	52
<b>Figura 31:</b> Etanol 1.368 % v/v, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	53
<b>Figura 32:</b> Etanol 15 % v/v, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	53
<b>Figura 33:</b> Etanol 35 % v/v, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	53
<b>Figura 34:</b> Etanol 55 % v/v, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	54
<b>Figura 35:</b> Etanol 68 % v/v, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	54
<b>Figura 36:</b> NaOH 0.318 % p/p, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	55
<b>Figura 37:</b> NaOH 1 % p/p, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	55
<b>Figura 38:</b> NaOH 2 % p/p, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	55
<b>Figura 39:</b> NaOH 3 % p/p, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	56
<b>Figura 40:</b> NaOH 3.68 % p/p, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.	56
<b>Figura 41:</b> a) Autoclave Esterilizadora eléctrica, b) Balanza analítica.	57
<b>Figura 42:</b> a) Centrifuga PowerSpin™, b) Espectrofotómetro UV-VIS.	57
<b>Figura 43:</b> a) Estufa para secado, b) Mufla para laboratorios	57
<b>Figura 44:</b> a) Medidor de pH Handylab, b) Micropipetas	58
<b>Figura 45:</b> a) Plancha de calentamiento, b) Rotoevaporador	58

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Composición de carbohidratos (g/100 g de monosacáridos en la fracción hidrolizada) de la microalga <i>Ch. calcitrans</i> .....	5
<b>Tabla 2:</b> Tipos de hidrólisis ácida. ....	8
<b>Tabla 3:</b> Reacciones de carbohidratos en medio básicos .....	9
<b>Tabla 4:</b> Etapas del proceso para la obtención de ART .....	13
<b>Tabla 5:</b> Caracterización de la biomasa. ....	14
<b>Tabla 6:</b> Condiciones de pretratamiento utilizando diferentes montajes, utilizando <i>Ch. gracilis</i> con floculante (150 ppm FeCl <sub>3</sub> ) y porcentajes de ART para cada etapa.....	16
<b>Tabla 7:</b> Porcentajes de ART para diferentes tipos de catalizadores, utilizando las iguales condiciones de pretratamiento. La biomasa utilizada fue <i>Ch. Gracilis</i> 150PPM FeCl <sub>3</sub> . ....	20
<b>Tabla 8:</b> Porcentajes de ART en la hidrólisis.....	22
<b>Tabla 9:</b> Valores y niveles de las variables seleccionadas.....	22
<b>Tabla 10:</b> Diseño experimental obtenido para la etapa de pretratamiento y resultados de ART en el pretratamiento, hidrólisis y totales. ....	23
<b>Tabla 12:</b> Resultados obtenidos para los puntos óptimos en la etapa de pretratamiento.....	25
<b>Tabla 13:</b> Componentes del medio f/2.....	35
<b>Tabla 14:</b> Traza de metales en solución en el medio f/2. ....	35
<b>Tabla 15:</b> Solución de vitaminas en el medio f/2. ....	36
<b>Tabla 16:</b> Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Chaetoceros gracilis</i> (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de FeCl <sub>3</sub> , por El Instituto Colombiano de Petróleo (ICP).....	37

<b>Tabla 17:</b> Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Ch.gracilis</i> (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de $\text{FeCl}_3$ , por La Universidad de Antioquia (UDEA) .....	37
<b>Tabla 18:</b> Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Ch. gracilis</i> (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de $\text{FeCl}_3$ , en el laboratorio .....	38
<b>Tabla 19:</b> Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Ch. calcitrans</i> (tres días de cultivo) floculada con 30 ppm de $\text{FeCl}_3$ , en el laboratorio .....	38
<b>Tabla 20:</b> Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Ch. gracilis</i> (tres días de cultivo) floculada con 30 ppm de $\text{FeCl}_3$ , en el laboratorio .....	38
<b>Tabla 21:</b> Reactivos usados. ....	39
<b>Tabla 22:</b> Absorbancia para diferentes concentraciones de glucosa, después de la reacción con DNS. ....	42
<b>Tabla 23:</b> porcentaje de humedad de la <i>Chaetoceros Calcitrans</i> 30 PPM $\text{FeCl}_3$ . ....	43
<b>Tabla 24:</b> porcentaje de humedad de la <i>Ch. Gracilis</i> 150PPM $\text{FeCl}_3$ . ....	44
<b>Tabla 25:</b> porcentaje de cenizas de la <i>Ch Calcitrans</i> 30 PPM $\text{FeCl}_3$ sin pretratamiento.....	45
<b>Tabla 26:</b> porcentaje de cenizas de la <i>Ch. Calcitrans</i> 30 PPM PPM $\text{FeCl}_3$ con pretratamiento.....	45
<b>Tabla 27:</b> porcentaje de cenizas de la <i>Ch. Gracilis</i> 150PPM $\text{FeCl}_3$ . ....	45
<b>Tabla 28:</b> porcentaje de lípidos extraídos en la microalga <i>Ch. Gracilis</i> 150PPM $\text{FeCl}_3$ . ....	47
<b>Tabla 29:</b> Porcentaje de lípidos extraídos en la microalga <i>Chaetoceros Calcitrans</i> 30 PPM $\text{FeCl}_3$ . ....	47

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A.</b> COMPOSICIÓN DEL MEDIO f/2 .....	35
<b>ANEXO B.</b> CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA.....	37
<b>ANEXO C.</b> REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN. ....	39
<b>ANEXO D.</b> PREPARACIÓN DE LA HIDRÓLISIS .....	40
<b>ANEXO E.</b> DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES (ART).....	41
<b>ANEXO F.</b> CONSTRUCCION DE LA CURVA GLUCOSA PARA EL REACTIVO DNS .....	42
<b>ANEXO G.</b> DETERMINACION DE HUMEDAD DE LAS MICROALGAS.....	43
<b>ANEXO H.</b> DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN LAS MICROALGAS.....	45
<b>ANEXO I.</b> MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS.....	46
<b>ANEXO J.</b> PORCENTAJES DE LIPIDOS EN LA MICROALGA .....	47
<b>ANEXO K.</b> ETAPAS DEL PROCESO.....	48
<b>ANEXO L.</b> GRÁFICAS DE SUPERFICIE Y DE CONTORNO .....	51
<b>ANEXO M:</b> PRINCIPALES EQUIPOS USADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN ...	56

## RESUMEN

**Título:** ESTUDIO DEL MÉTODO DE PRETRATAMIENTO QUÍMICO ETANOL-NaOH PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES A PARTIR DE MICROALGAS, COMO VÍA A LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL\*.

**Autores:** NEILA MILENA MANTILLA BARBOSA, MARÍA INÉS JARAMILLO GUTIÉRREZ\*\*.

**Palabras claves:** Microalgas, biomasa, pretratamiento etanol-base, hidrólisis, azúcares reductores totales (ART).

Este trabajo plantea un método para la extracción de azúcares reductores totales (ART) a partir de microalgas, para utilizarlos en una posterior etapa de fermentación en la producción de etanol. Basado en el proceso de producción de biocombustibles de segunda generación se sometieron las microalgas *Chaetoceros Gracillis* y *Chaetoceros Calcitrans* a un pretratamiento químico, en el cual, la pared celular, donde se concentra la mayor cantidad de carbohidratos, sea destruida, extrayendo los azúcares reductores presentes. Durante el proceso la biomasa se trató con una mezcla de etanol y NaOH, a 120°C y 2 atm, donde se estudiaron variables como Concentración de NaOH (%p/p), concentración de Etanol (%v/v), y tiempo de pretratamiento (min); la variable de respuesta fue el porcentaje de ART en el pretratamiento, utilizándose un diseño central compuesto circunscrito como herramienta de análisis. Los resultados muestran que el NaOH presentó un efecto negativo en el pretratamiento, aunque destruye la membrana celular, genera reacciones indeseadas, disminuyendo considerablemente el rendimiento del proceso; por su parte el etanol muestra un efecto positivo en el pretratamiento, ya que permite que los carbohidratos se solubilicen en el licor en tiempos moderados. La optimización se realizó después de analizado el punto de silla obtenido en el análisis estadístico, encontrando las mejores condiciones (0,318 % p/p de NaOH, 80 % v/v de Etanol y 20 min). Este trabajo fue realizado por la Universidad Industrial de Santander dentro del desarrollo del proyecto "Bioprospección de las microalgas colombianas para la producción de biodiesel" con código 2008D3871-3665, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en cooperación con el Instituto Colombiano del Petróleo y la Corporación Instituto Morrosquillo.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov, Codirectores: Msc. Laura Liliana Garzón Fuentes, ICP-ECOPETROL, Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano.

## ABSTRACT

**Title:** STUDY OF METHOD OF CHEMICAL PRETREATMENT ETHANOL-NAOH FOR OBTAINING REDUCING SUGAR FROM MICROALGAE, AS A WAY TO PRODUCE BIOETHANOL.\*

**Authors:** NEILA MILENA MANTILLA BARBOSA, MARÍA INÉS JARAMILLO GUTIÉRREZ\*\*.

**Keywords:** Microalgae, biomass, Ethanol-NaOH pretreatment, hydrolysis, Total reducing sugars.

This work presents a method for the extraction of total reducing sugars from microalgae, for its use at a later stage of fermentation in ethanol production. Based on the production process of second generation biofuels, microalgae *Chaetoceros gracillis* and *Chaetoceros calcitrans* were subjected to a chemical pretreatment in which the cell wall, which concentrates the largest amount of carbohydrates, is destroyed, removing the reducing sugars present. During the process the biomass was treated with a mixture of ethanol and NaOH, at 120°C and 2 atm, the variables studied were NaOH concentration (% w/w) ethanol concentration (% v/v) and pretreatment time (min); the response variable was the percentage of ART in the pretreatment, using a central composite circumscribed design as analysis tool. The results show that the NaOH has a negative effect on the pretreatment, even when destroys the cell membrane, generates unwanted reactions, which reduce significantly the process performance, in the other hand, ethanol has a positive effect on the pretreatment, since it allows the dilution of carbohydrates in the liquor on moderate times. Optimization was made after analyzing the saddle point obtained in the statistical analysis, finding the best conditions (0.318% w / w NaOH, 80% v / v ethanol and 20 min). This work was developed by Industrial University of Santander within the project "Bioprospección de las microalgas colombianas para la producción de Biodiesel" code 2008D3871-3665, funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development, in cooperation with the Colombian Petroleum Institute (ICP-ECOPETROL), and the Instituto Morrosquillo Corporation.

---

\* Graduate project.

\*\* Faculty of Physicochemical Engineering, Chemical Engineering School. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov, Codirectores: Msc. Laura Liliana Garzón Fuentes. ICP-ECOPETROL, Biologist Andrés Fernando Barajas Solano.

## INTRODUCCIÓN

Debido a la escasez que se está produciendo de petróleo crudo y el calentamiento global, se han generado diversas iniciativas para la producción de otras fuentes de energía, como lo son los biocombustibles, siendo estos de tipo biológico, obtenidos de manera renovable de restos orgánicos. Los biocombustibles más usados y desarrollados son el bioetanol y el biodiesel [1].

El bioetanol, a diferencia del petróleo, es una forma de energía renovable que pueden ser producidos a partir de materias primas agrícolas. Esto se puede hacer de cultivos muy comunes, tales como la caña de azúcar, la papa, la yuca y el maíz. Sin embargo, ha habido un debate considerable acerca de la forma en cómo el bioetanol será útil en la sustitución del combustible fósil. Las preocupaciones sobre su producción y uso se refieren a la gran cantidad de tierra cultivable necesaria para los cultivos, así como el equilibrio energético y la contaminación de todo el ciclo de producción de etanol [2].

La utilización de fuentes de naturaleza orgánica diferentes a los cultivos tradicionales para la producción de biocombustibles puede suponer la solución al debate social originado en este sector. Recurrir a fuentes alternativas a los cultivos tradicionales, como biomasa lignocelulósica (biocombustibles de segunda generación) y microorganismos (biocombustibles de tercera generación), entre ellos las microalgas, sería más eficaz [3].

La producción masiva de microalgas puede satisfacer dicha necesidad ya que no compite con el sector alimentario, no requiere de grandes superficies, ni de terrenos fértiles y maximiza el ahorro de agua (ciclo cerrado) para su cultivo. Al mismo tiempo, contribuye a la mejora medioambiental mediante la captación de CO<sub>2</sub> y puede integrar la utilización de efluentes industriales salinos [4].

Se ha investigado en la producción de etanol partir de microalgas donde ellas mismas sean capaces de acumular naturalmente abundantes carbohidratos en sus células y formar un Slurry que es mantenido en ambientes oscuros y anaerobios bajo un pH de 6.0 a 9.0 [5]; presentando barreras tecnológicas como la obtención de un medio heterotrófico viable.

Las microalgas son ricas en carbohidratos, los cuales se encuentran principalmente en su pared celular, además, las microalgas no contienen lignina, suponiéndose mayor facilidad para la extracción de los azúcares reductores y pasar a una posterior etapa de fermentación.

El objetivo de este estudio, es extraer los azúcares reductores de una especie de microalgas por medio de un pretratamiento químico con álcali y etanol, haciendo una analogía con los pretratamiento utilizados para la extracción de estos azúcares en el bagazo de materiales lignocelulósicos. Las condiciones de operación se plantean más suaves ya que las microalgas carecen de lignina que es uno de los principales problemas en la producción de biocombustibles de segunda generación.

La idea de obtener etanol a partir de microalgas podría revolucionar la nascente industria de los biocombustibles, eliminando sus principales ataduras. Con el debido proceso pueden adaptarse a distintos ambientes, no utilizan tierras fértiles y ofrecen excelentes rendimientos por hectárea.

En el caso de las microalgas, el activo estratégico ya no es la disponibilidad de tierras fértiles, sino el manejo de la tecnología del proceso de producción. La importancia de la investigación sobre las distintas especies de microalgas y el proceso de producción de etanol y biodiesel marcan los ejes centrales que deberían apuntar a la producción a gran escala, donde se obtuviera una alternativa viable para la producción de biocombustibles.

## **1. MARCO TEÓRICO**

Ante la constante demanda mundial de combustible paralela a la preocupación por la conservación de medio ambiente, lleva a la búsqueda nuevas fuentes de combustibles que sean competitivas y que su vez no generan desabastecimientos alimenticios. Como alternativas para dar solución a la presente situación han surgido algunas fuentes como son los residuos agrícolas, residuos de madera, residuos urbanos y las microalgas [6].

### **1.1 Microalgas**

Las microalgas comprenden un amplio grupo de organismos fotosintéticos y heterótrofos que tienen un extraordinario potencial para cultivos energéticos. Pueden ser cultivadas en difíciles condiciones agro-climáticas y son capaces de producir una amplia gama de subproductos comercialmente interesantes, tales como grasas, aceites, azúcares y compuestos bioactivos [7].

Las microalgas tienen una gran capacidad para la producción de biodiesel por su alto contenido de lípidos y para la producción de bioetanol por su riqueza en carbohidratos, además carecen de lignina un componente estructural de las plantas y una sustancia recalcitrante que es un obstáculo para la producción de biocombustible de segunda generación [8].

### **1.2 Clasificación de las microalgas**

En la clasificación de las microalgas se utilizan distintos criterios, tales como las clases y combinación de los pigmentos fotosintéticos presentes, pared celular, caracteres bioquímicos derivados de la citología y morfología de los organismos e incluso el ciclo de vida puede tener importancia en la delimitación de ciertas clases.

La siguiente es una clasificación de las dos especies trabajadas durante el proyecto *Cheatoceros Gracilis* y *Cheatoceros calcitrans*, la cual fue obtenida de Algaebase, base de datos global de especies de todos los grupos de algas[9]:

**Empire** Eukaryota

**Kingdom** Chromista

**Subkingdom** Chromobiota

**Infrakingdom** Heterokonta

**Phylum** Bacillariophyta (Diatomea)

**Class** Coscinodiscophyceae

**Subclass** Chaetocerotophycidae

**Order** Chaetocerotales

**Family** Chaetocerotaceae

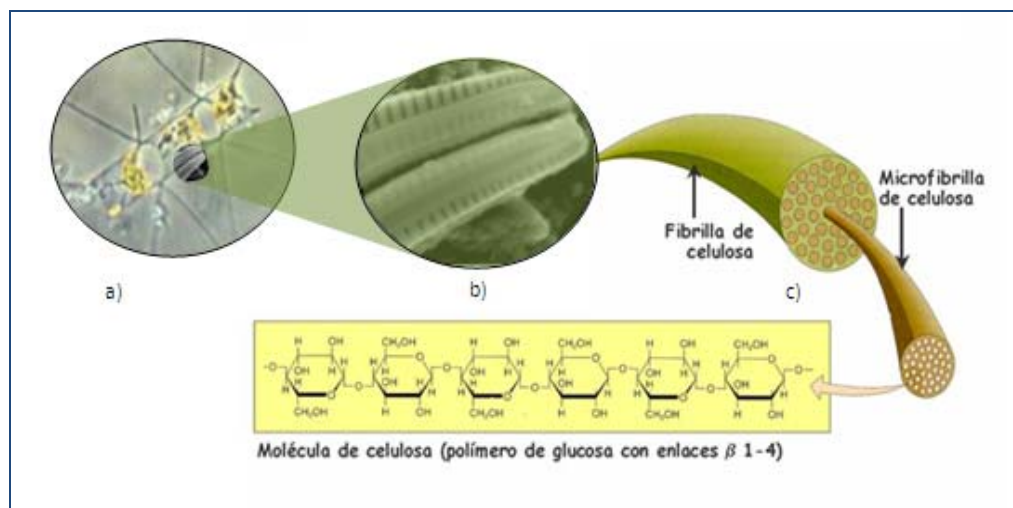
**Genus** Chaetoceros

- **Specie** *Chaetoceros gracilis* Pantocsek 1892
- **Specie** *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* Takano

### 1.3 Características de las microalgas

#### 1.3.1 Composición bioquímica

La concentración de proteínas carbohidratos y lípidos puede modificarse alterando las condiciones ambientales como: concentración de nutrientes, temperatura, intensidad lumínica y estado fisiológico. La composición de carbohidratos en azúcares específicos puede variar considerablemente entre los diferentes tipos de algas. Generalmente la glucosa se encuentra en concentraciones mayores seguido por galactosa, manosa y ribosa con otros azúcares en variadas proporciones [10].

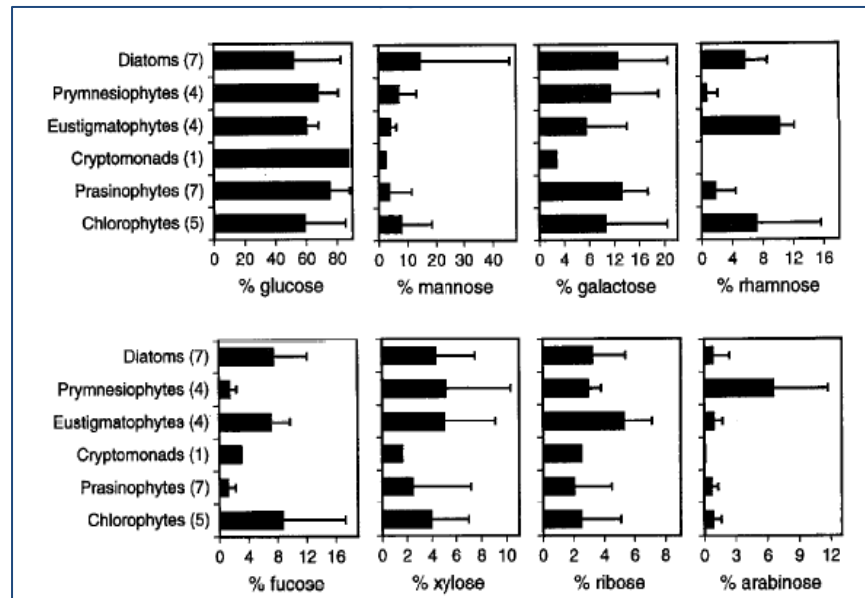


**Figura 1:** a) Imagen bajo el microscopio de *Ch. Calcitrans*, b) Vista cinturón que muestra el campo de poro apical, c) Fibrilla y microfibrilla de celulosa. Fuente: Bill Harding, Diatoms Hardcopy Taxonomic Key [11].

**Tabla 1:** Composición de carbohidratos (g/100 g de monosacáridos en la fracción hidrolizada) de la microalga *Ch. calcitrans*. Fuente: Brown et al 1989 [12].

COMPOSICIÓN DE AZÚCAR	<i>Ch. calcitrans</i> (g/100 g de monosacáridos)
Ramnosa	1.1
Fucosa	5.3
Ribosa	10.9
Xylosa	1.1
Manosa	1.4
Galactosa	12,4
Glucosa	66.3
Inositol	1.6

Los polisacáridos de las diatomeas contienen predominantemente Crisolaminarina (Leucosina) y mananos, considerando que los fitoflagelados contienen glucanos, principalmente glucosa y galactosa [13]. En la figura 2 se muestra una comparación entre diferentes Phylum de microalgas, mostrando específicamente el porcentaje de diferentes tipos de azúcares.



**Figura 2:** Composición de azúcares polisacáridos de diferentes microalgas, particularmente Diatomeas (porcentaje de azúcares totales). Los Histogramas representan los valores promedio en las diferentes phylum de algas [13].

### 1.3.2 Pared celular

Las diatomeas constituyen un grupo especial entre las algas por la participación característica de su pared celular silicificada (frústulo) y constituida por dos mitades (valvas) que se corresponden mutuamente. El frústulo está compuesto de aminoácidos y azúcares impregnados íntegramente por sílice que está compuesta por el silicón que es una forma del ácido silícico. La mayoría de los frústulos son gruesos y resistentes a la pared celular. Se facilita la separación de las valvas cuando estos organismos son tratados con ácidos y álcalis fuertes [14].

### 1.4 Pretratamientos

El objetivo al aplicar un pretratamiento es hacer al material celulósico más susceptible, facilitando de esta forma la extracción de los carbohidratos hidrolizables presentes en estos materiales [15]. El pretratamiento en materiales lignocelulósicos es utilizado para remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la

cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad en estos materiales. En el caso de las microalgas, las cuales no poseen lignina, el pretratamiento está encaminado a provocar el rompimiento de la pared celular, generando un desacomodamiento en la de la estructura celular, liberando los carbohidratos contenidos en la célula e hidrolizarlos.

#### **1.4.1 Pretratamientos aplicados a microalgas**

El pretratamiento que se ha aplicado a las microalgas hasta ahora, está enfocado a acondicionar el sustrato antes de la digestión anaeróbica, permitiendo mejorar considerablemente su biodegradabilidad: este paso hace a la materia orgánica más accesible y por lo tanto más fácilmente degradable [16].

Los pretratamientos físicos tales como: técnicas de separación, concentración o deshidratación se han aplicado en las microalgas para movilizar y maximizar la proporción de materia orgánica a ser digerida. Los pretratamientos Químicos (ácidos, bases, ozonización), térmicos y los pretratamientos de ultrasonidos mejoraran la desintegración de la mayor parte de la fracción orgánica [17]. Estos pretratamientos incrementan la cinética de la producción y rendimiento de metano [18].

#### **1.4.2 Pretratamientos químicos**

Existen diferentes tipos de pretratamientos químicos los cuales pueden ser aplicados de acuerdo al compuesto que se desee extraer [15]. Para el objeto de este trabajo se utilizó el pretratamiento químico Etanol-Base.

##### **1.4.2.1 Pretratamiento Etanol-Base**

Los pretratamientos etanol-base han sido utilizados para deslignificar materiales lignocelulósicos, debido a que combinación alcohol-álcali reduce la tensión superficial del licor de pretratamiento a elevada temperatura de proceso, lo que facilita la penetración del álcali en la biomasa y la difusión del producto de

reacción con la lignina hacia el seno del licor [19]. Simultáneamente el alcohol también degrada la lignina durante el periodo de alta temperatura y su presencia aumenta la selectividad de la soda por la lignina. El álcali dentro del sistema puede actuar como catalizador o puede acentuar la selectividad del sistema hacia la lignina, como un efecto de tipo sinérgico [20].

En las microalgas se busca utilizar el método químico etanol-base con el fin de favorecer el rompimiento de la pared celular por acción del NaOH, basándose para ello en métodos de extracción de proteínas en los cuales se utiliza el NaOH disuelto en agua a bajas concentraciones (0,1N) y altas temperaturas (100°C). De esta manera se provoca el rompimiento de la pared celular debido a su elevado pH [21]. Por su parte la mezcla etanol-agua del licor a alta temperatura, permite solubilizar los carbohidratos que son liberados al romperse la pared celular [22].

### 1.5 Hidrólisis ácida.

La hidrólisis ácida es un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales [23]. El ácido más utilizado para este proceso es el ácido sulfúrico. Los diferentes tipos de hidrólisis los podemos encontrar en la tabla 2 [23].

**Tabla 2:** Tipos de hidrólisis ácida.

TIPOS DE HIDRÓLISIS	CONDICIONES	RENDIMIENTOS	OBSERVACIONES
Hidrólisis con ácidos concentrados	Bajas temperaturas, tiempo de residencias mayores que en la hidrólisis diluida	Altos rendimiento (superiores al 90% de la glucosa potencial)	Alto costo de recuperación del ácido empleado, efectos corrosivos en los equipos. Etapa costosa de neutralización.
Hidrólisis con ácidos diluidos	Altas temperaturas, tiempo de residencias cortos	Los mejores rendimientos alcanzados son del 60% del teórico	Bajo consumo de ácidos, origina mayor corrosión en los equipos, debido a las altas temperaturas

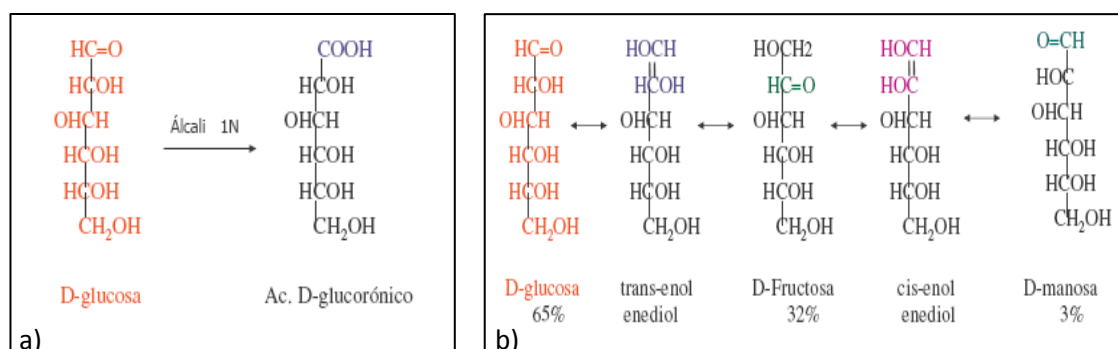
Cuando se utiliza hidrólisis en dos etapas, en la primera y bajo condiciones más suaves, se produce la hidrólisis de la hemicelulosa, que por su estructura resulta más fácilmente hidrolizable. Esto permite que, durante la segunda etapa, y bajo unas condiciones más severas, se produzca la hidrólisis de la celulosa, evitándose la degradación de los azúcares hemicelulósicos producidos en la primera etapa. Mediante los procesos en dos etapas es posible conseguir hasta un 98% de recuperación de los azúcares hemicelulósicos a partir de maderas blandas. Sin embargo, los rendimientos en glucosa no superan el 50% [23].

### 1.6 Reacciones durante el pretratamiento

Dentro de las reacciones que presentan los carbohidratos en medio básico, se encuentran reacciones de enolización. Particularmente el NaOH enoliza los azúcares y provoca su rompimiento en fragmentos reactivos que pueden oxidarse fácilmente [24]. En la tabla 3, podemos observar algunas de éstas reacciones.

**Tabla 3:** Reacciones de carbohidratos en medio básicos

CONDICIONES	REACCIÓN	PRODUCTOS
Álcalis (0,05 N)	Enolización	Isómeros
Álcalis (0,5 N)	Enolización/ hidrólisis	Enoles, diacetilo, acetoína, ácidos
Álcalis (1 N)	Enolización/ Oxidación	Isómeros



**Figura 3:** Mecanismos de reacción de los carbohidratos. a) Oxidación a ácidos glucónicos, b) Reacción de enolización, (álcalis débiles 0.05N), arreglo de Lobry y Alberda Van Eckenstein.

### 1.7 Diseño experimental.

El diseño de experimentos consiste en planear un conjunto de pruebas experimentales de tal manera que los datos generados puedan analizarse estadísticamente para obtener conclusiones validas y objetivas acerca del sistema o proceso [24]. Las herramientas de análisis para este trabajo fueron:

**Diseño de composición central:** Se emplea en la etapa de búsqueda de segundo orden, se puede construir a partir de un diseño factorial  $2^k$ , agregando puntos sobre los ejes y al centro del diseño. Es el más utilizado en la etapa de búsqueda debido a su gran flexibilidad, permitiendo estudiar además de los efectos lineales y de interacción los efectos cuadráticos o de curvatura [25].

**Metodología de superficie de respuesta:** Es la estrategia experimental y de modelación que permiten encontrar las condiciones óptimas de un proceso [25].

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Este capítulo describe la metodología experimental seguida para cumplir los objetivos propuestos, la figura 4 describe las etapas del proceso que se siguieron para lograr la extracción de Azúcares Reductores Totales (ART).

Ya que es un método nuevo, la metodología mostrada en la figura 4 se estableció experimentalmente, para ello, se hicieron varios ensayos buscando la mejor alternativa que redujera las pérdidas de masa y lograra una mayor eficiencia del proceso, utilizando los materiales al alcance.

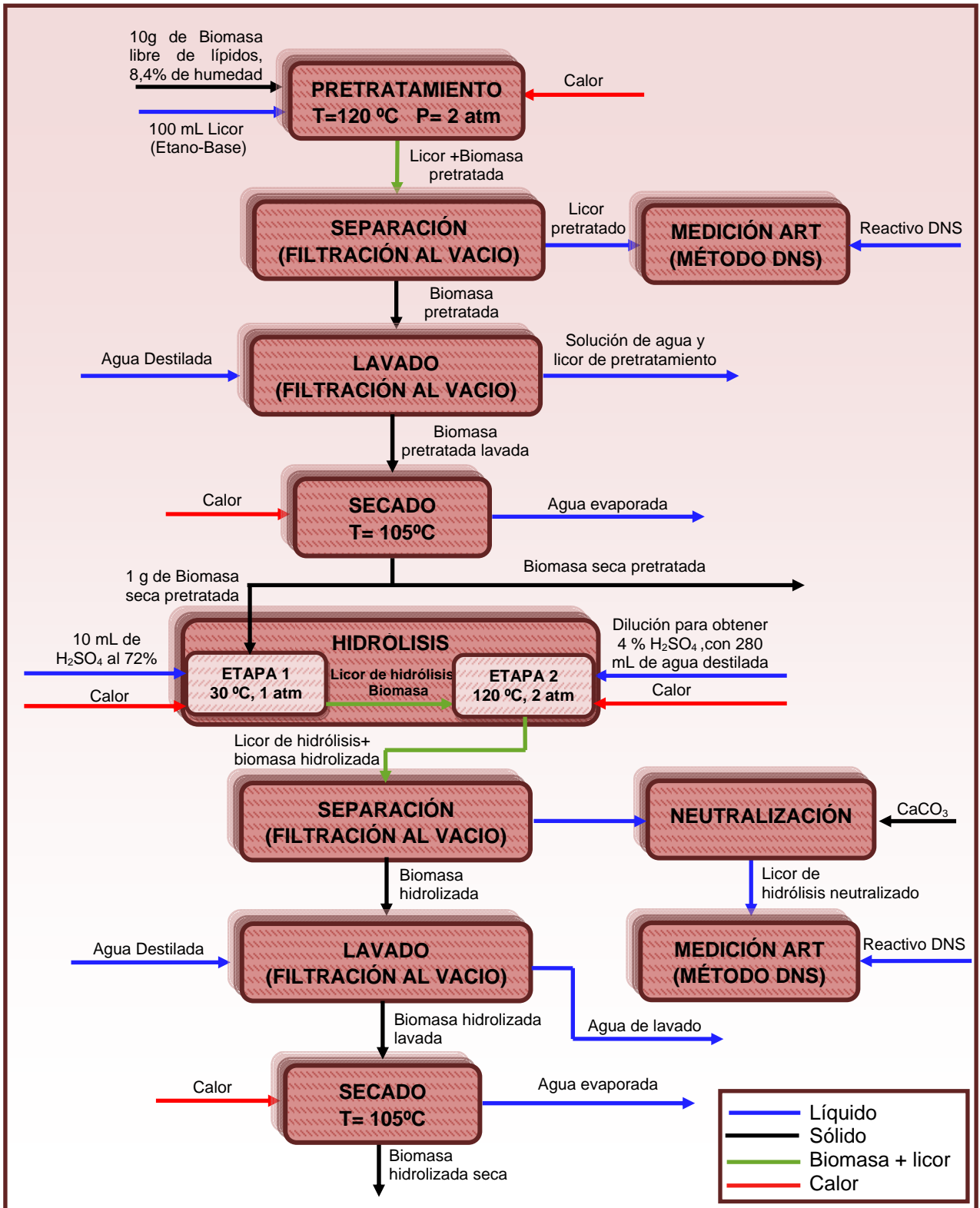


Figura 4: Diagrama de flujo de proceso para la extracción de azúcares reductores.

## 2.1 Materiales

### 2.1.2 Equipos (Ver anexo N)

- Autoclave Esterilizadora eléctrica de marca All American Modelo 25X con una presión máxima de 20Psi y 259°F;
- Balanza analítica de marca precisa modelo XB220A, precisión  $\pm 0,0001$  g;
- Centrifuga *PowerSpin*<sup>TM</sup> modelo MX 8624 de marca UNICO;
- Destilador MonoDest 3000 de marca BRAND;
- Espectrofotómetro UV-VIS Spectroquant Pharo 300 de marca Merck con un rango de longitud de onda entre 190 y 1100 nm;
- Estufa para secado serie ED 23 de marca Binder;
- Mufla para laboratorios marca CRAFT;
- Medidor de pH Handylab 11, marca SCHOTT instruments, precisión  $\pm 0,01$ ;
- Micropipetas Transferpette de 500 $\mu$ L y 5 mL de marca BRAND;
- Plancha de calentamiento de marca VELP Scientifica.
- Manta de calentamiento, Capacidad 500 mL.

### 2.1.3 Materia prima

Las microalgas que fueron suministradas por la Corporación Instituto Morrosquillo, ubicado en el departamento de Sucre, Colombia, son:

- *Ch gracilis* 150 ppm FeCl<sub>3</sub>: Pruebas preliminares generales e influencia del floculante en la obtención de azúcares.
- *Ch calcitrans* 30 ppm FeCl<sub>3</sub>: Utilizada en diseño experimental y optimización del proceso. La edad del cultivo, 3 días, el medio de crecimiento es Guillard f/2 (ver anexo A).

### 2.1.4 Preparación de la materia prima

Antes de realizar todos los experimentos, la biomasa fue macerada usando un mortero para uniformidad de la biomasa. Una vez triturada fue almacenada en bolsas plásticas para conservar sus propiedades.

## 2.2 Diseño experimental

### 2.2.1 Diseño experimental de los pretratamientos

Para el estudio del pretratamiento químico etanol-base se realizaron inicialmente experimentos preliminares que permitieron conocer el rango de operación de las variables a analizar, este paso fue necesario, ya que no hay referencias bibliográficas al respecto. Posteriormente se realizó un diseño central compuesto, donde fueron estudiadas 3 variables del proceso: tiempo de pretratamiento (min), Concentración de etanol (%v/v) y concentración de NaOH (%p/p). De acuerdo a los resultados obtenidos en este diseño se realizaron experimentos posteriores con los puntos óptimos obtenidos.

### 2.2.2 Etapas del proceso

**Tabla 4:** Etapas del proceso para la obtención de ART

ETAPA	EQUIPO	CONDICIONES	PROCEDIMIENTO
<b>Pretratamiento</b>	Autoclave	Las determinadas por el diseño experimental. 2 atm, 120°C en la autoclave	Se pesó 10 g de biomasa y se mezcló con 100 mL de licor (Etanol+agua+NaOH), a las condiciones dadas.
<b>Separación</b>	Bomba de vacío, erlenmeyer con salida lateral, embudo buchner y papel filtro	Vacío	El licor pretratado se colocó en el sistema de vacío, hasta que el sólido se separara del líquido por completo.
<b>Lavado</b>	Bomba de vacío, erlenmeyer con salida lateral, embudo buchner y papel filtro	Vacío	Una vez separado el sólido, sobre el mismo papel filtro se lavó la biomasa 6 veces.
<b>Secado (Lap-NREL/TP-510-42621)</b>	Estufa	105°C, durante mínimo 4 horas	La biomasa lavada se puso en la estufa hasta alcanzar peso constante.
<b>Hidrólisis (Lap-NREL/TP-510-</b>	1 Baño termostático, tubos de ensayos	1 hora en el baño a 30°C	Se colocó 1 g de muestra en cada tubo y se le adiciona ácido al 72%

42618)	2	Autoclave y erlenmeyer	2 atm, 120°C	El Licor que reaccionó en la etapa 1 se colocó en un erlenmeyer y se diluyó con 280 mL de agua obteniéndose el 4% de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
<b>ETAPA</b>		<b>EQUIPO</b>	<b>CONDICIONES</b>	<b>PROCEDIMIENTO</b>
<b>Neutralización</b>		Medidor de pH	Ácidas y básicas.	Se tomaron muestras de 14 mL y se neutralizaron con CaCO <sub>3</sub> .
<b>Determinación de la concentración de ART. Método DNS, descrito por MILLER (1959).</b>		Espectrofotómetro, baño termostático, tubos de ensayo, micropipetas.		Se adicionó 0.5mL de las muestras en cada tubo de ensayo y 0,5 mL de DNS. Los tubos fueron mantenidos en un baño a 95°C por 5 min para el desarrollo de la coloración rojiza, después de este tiempo reaccional las muestras se enfriaron en un baño de hielo, luego se adicionando 5 mL de agua. Los tubos se agitaron para homogenizar la solución y las lecturas de absorbancia se efectuaron en un espectrofotómetro a 540 nm.

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 3.1 Caracterización de la biomasa

La biomasa utilizada fue caracterizada con contenido de humedad, cenizas, proteínas y lípidos.

**Tabla 5:** Caracterización de la biomasa.

Prueba	<i>Ch. Gracilis</i> 150 ppm FeCl <sub>3</sub>		<i>Ch. Calcitrans</i> 30 ppm FeCl <sub>3</sub>	
	Pretratada	Sin pretratar	Pretratada	Sin pretratar
% humedad	-	14.847	-	8.47
% Lípidos	0.51	1.23	1.6	3.25
% cenizas	52.8783	44.9156	60.76	40,67
% Proteínas	-	9,88	-	-

Todos los tipos de microalgas suministradas fueron secadas inicialmente en la Corporación Instituto Morrosquillo al sol. El procedimiento para determinar el porcentaje de cenizas se encuentra en el anexo H.

Para extraer los lípidos contenidos en las microalgas se utilizó el método Soxhlet (ver anexo I). La cuantificación de lípidos se realizó por la pérdida de peso sufrida en la biomasa luego de la extracción. Para determinar la presencia de lípidos, se utilizó un rotoevaporador, con el fin de recuperar la mayor cantidad de solvente y al líquido residual se le adicionó una solución de NaOH (10% p/p), para observar mediante la formación de espuma la presencia de lípidos saponificables.

En la tabla 5, se observa que la cantidad extraída con respecto al porcentaje de lípidos es menor en la biomasa pretratada, que en aquella que no sufrió ningún pretratamiento, esto se debe posiblemente a que durante el pretratamiento se liberaban algunos compuestos, como proteínas carbohidratos o lípidos, al romperse la pared celular.

### **3.2 Experimentos preliminares**

En los experimentos preliminares los valores se variaron “cada vez”, manteniendo constantes los demás, proporcionando el efecto de una única variable a las condiciones seleccionadas y fijas. Con este método no se estudió el efecto simultáneo de los factores (no se estudió la interacción entre ellos), pero sirvió de aproximación para obtener la región experimental.

Se realizaron experimentos preliminares con el objetivo de determinar los rangos de operación de las variables de estudio: Tiempo (min), Concentración de etanol (% v/v) y Concentración de NaOH (% p/p) en el diseño experimental, la variable de respuesta en estos experimentos fue el porcentaje de ART.

**3.2.1 Montaje a utilizar:** Se analizaron dos tipos de montajes para el pretratamiento



**Figura 5:** Montajes analizados: a) Con recirculación a presión atmosférica b) Autoclave a 121°C y 2 atm.

- Montaje con recirculación de gases, manejando condiciones de 78°C y presión atmosférica durante 2 horas.
- Autoclave en la cual se mantuvo la presión en 121°C y 2 atm durante 30 min.

La tabla 6 muestra las diferentes condiciones y porcentajes de ART para los dos montajes planteados.

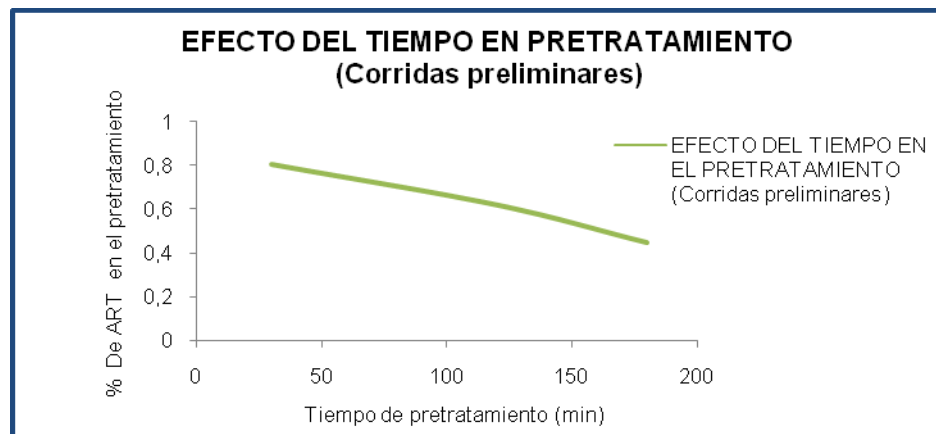
**Tabla 6:** Condiciones de pretratamiento utilizando diferentes montajes, utilizando *Ch. gracilis* con floculante (150 ppm FeCl<sub>3</sub>) y porcentajes de ART para cada etapa.

Nº	Montaje	NaOH (%p/p)	Etanol (% v/v)	Tiempo (min)	% ART PRET.	% ART HIDRÓL.	% ART TOT.
1	Recirculación	100	50	120	0.6143	0.6888	1.303
2	Autoclave	100	50	30	<b>0.8617</b>	1.1942	2.056
3	Recirculación	50	50	120	0.4737	0.9130	1.387
4	Autoclave	50	50	30	<b>0.8017</b>	0.5775	1.379

El montaje que permite obtener mejores resultado durante el pretratamiento es el que utiliza la autoclave, la cual trabaja a 120°C y 2 atm durante 1 hora. Dando a

entender que condiciones altas de presión y temperatura favorecen el rompimiento de la membrana celular, obteniéndose así mejores resultados.

**3.2.2 Tiempo de pretratamiento:** Se mantuvieron constantes las siguientes condiciones: 50 %v/v de etanol y 25% p/p de NaOH, variándose el tiempo de 30-180 min. En la figura 6 se observa que el tiempo de pretratamiento debe ser moderado, ya que al disminuirlo aumenta el porcentaje de ART extraídos.



**Figura 6:** Efecto del tiempo en el pretratamiento en las corridas preliminares, para concentración de NaOH de 25% p/p y de etanol 50 % v/v.

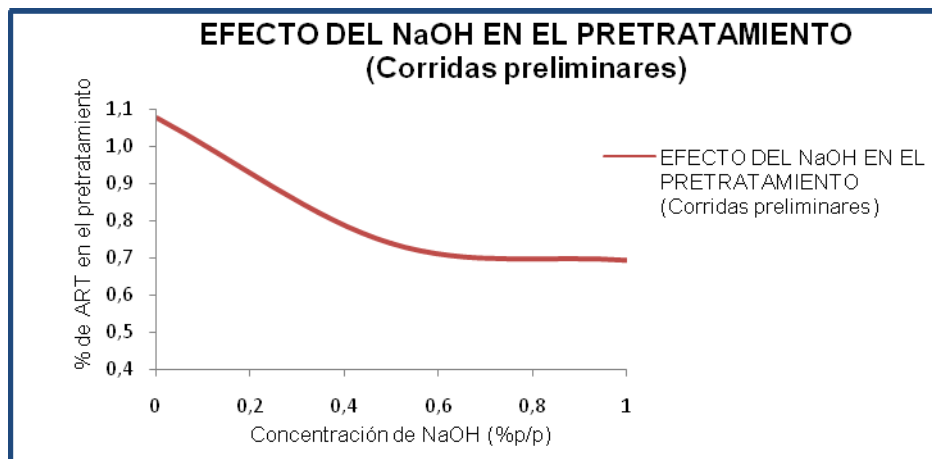
El efecto causado por el tiempo se explica si tenemos en cuenta que al aumentar el tiempo aumenta la cantidad de etanol evaporado, el etanol a esta presión (2 atm) bulle a 97,5 °C, por lo tanto a medida que el tiempo transcurre en el pretratamiento el etanol está siendo evaporado, disminuyendo la solubilidad de los azúcares en el licor de pretratamiento, esperando que el etanol junto con el NaOH, actuaran de manera complementaria favoreciendo el rompimiento de la pared tal como ocurre en materiales lignocelulósicos y solubilizando los azúcares en el licor.

Por lo tanto la región experimental seleccionada en el diseño central compuesto circunscrito con respecto al tiempo fue desde 9,54 min hasta 110 min.

**3.2.3 NaOH en el pretratamiento:** La concentración de NaOH (%p/p de biomasa secada) se varió en un rango de 0 a 50 % p/p en base seca, debido a que para

materiales lignocelulósicos se utilizan altas concentraciones de NaOH en el licor; el porcentaje de etanol se mantuvo en 50% v/v y el tiempo se estableció en 180 min.

En la Figura 7 se observa que el porcentaje de ART en el pretratamiento aumenta en la medida en que se disminuya la concentración de base.



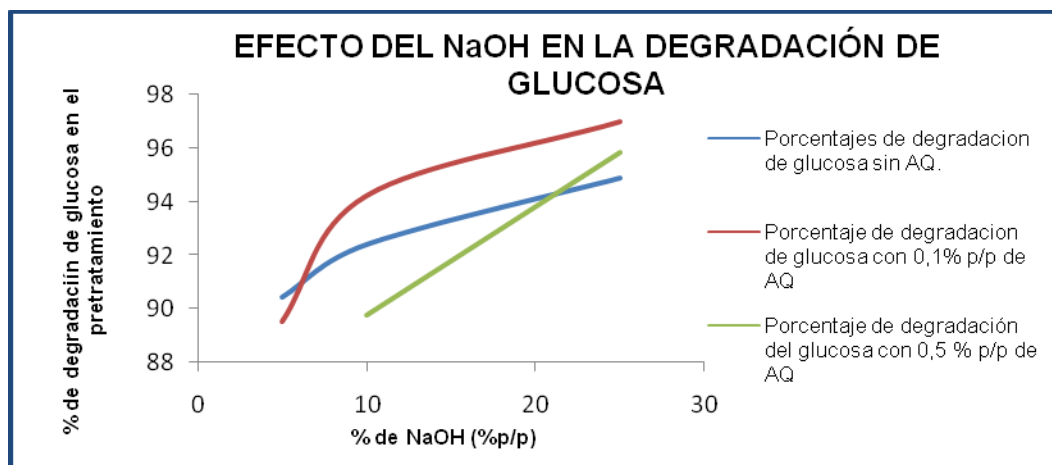
**Figura 7:** Efecto del NaOH en el pretratamiento en las corridas preliminares para una concentración de etanol del 50 % y un tiempo de 180 min.

El efecto que causa el NaOH se debe a que el hidróxido de sodio reacciona con los carbohidratos presentes en el licor de pretratamiento y los degrada. Sin embargo se buscaba que el NaOH causara la desestabilización de la membrana, permitiendo la liberación de los carbohidratos, por lo cual no se eliminó del pretratamiento. Ya que los factores se variaron “cada vez” manteniendo constantes los demás, no se estudió la interacción entre las variables, por lo cual no se sabía el efecto que causaría el álcali. Por esta razón se decidió utilizar el NaOH con bajas concentraciones, desde 0,318 %p/p hasta 3% en la región experimental para el diseño central compuesto.

**3.2.4. Degradación de la glucosa:** Con el fin de evitar la degradación de los azúcares en el pretratamiento por la acción del NaOH, se realizaron pruebas con antraquinona, ya que esta causa una oxidación del grupo reductor terminal de los

carbohidratos, generando una estabilidad en cuanto a las reacciones de despolimerización terminal, protegiendo los carbohidratos de una posible degradación.

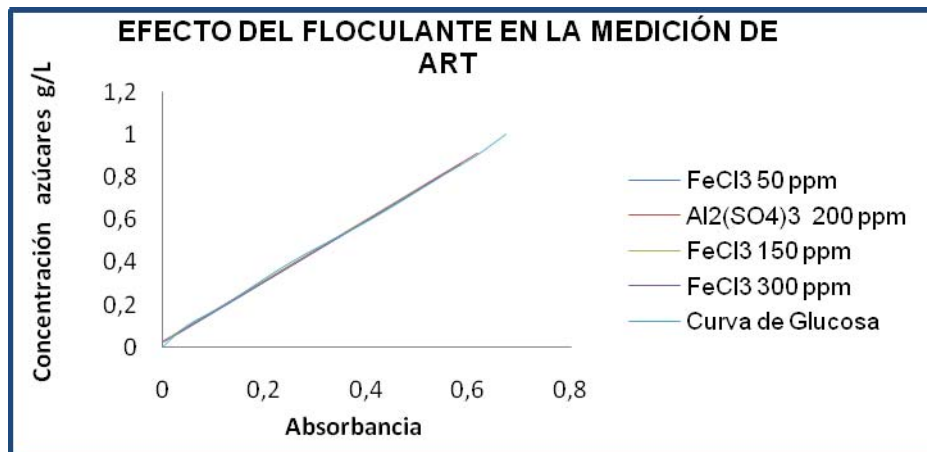
Según los resultados mostrados en la figura 8, el 0,1% de antraquinona reportado en la literatura [27], no muestra un efecto positivo comparándolo con el que no utiliza antraquinona, pero aumentando su porcentaje a 0.5%p/p, se nota una leve disminución en la degradación de la glucosa, sin embargo, no justificando el uso de este reactivo en el resto de pruebas de la investigación, puesto que esta disminución en la degradación no compensa los costos de su uso y su toxicidad. Se determinó el porcentaje de degradación de glucosa durante la hidrólisis, el cual fue de 4,71%, un porcentaje considerablemente inferior al obtenido durante el pretratamiento (95% aproximadamente).



**Figura 8:** Efecto del NaOH con y sin antraquinona en la degradación de la glucosa, utilizando 50 % v/v de etanol y 120 min.

**3.2.5. Interferencia del floculante en la medición de ART:** Las microalgas suministradas por la Corporación de Morrosquillo contenían cierta cantidad de floculante, el cual de acuerdo a la concentración utilizada cambia el color de la biomasa de microalgas, puesto a que el método utilizado para determinar ART es colorimétrico (DNS), fue necesario realizar pruebas que tenían como objetivo

determinar la interferencia del floculante en la medida de ART que es leída a 540 nm, una región cercana al color dado por el floculante. En la figura 9 se puede observar las diferentes curvas para diferentes concentraciones del cloruro férrico y para el sulfato de aluminio comparándolos con la curva de glucosa utilizando el método DNS (dinitrosalicílico).



**Figura 9:** Efecto del floculante en la medición de ART.

Como se puede observar en la figura 9, las líneas están superpuestas sobre la curva de glucosa mostrando que no existe interferencia significativa en la medida con respecto a la cantidad de floculante en la biomasa, lo que indica que las mediciones de ART por el método DNS son confiables en este aspecto.

**3.2.6 Efectos en el uso de otros Catalizadores en el pretratamiento:** Estas pruebas se realizaron con el fin de conocer la efectividad de otros catalizadores en el pretratamiento.

**Tabla 7:** Porcentajes de ART para diferentes tipos de catalizadores, utilizando las iguales condiciones de pretratamiento. La biomasa utilizada fue *Ch. Gracilis* 150PPM FeCl<sub>3</sub>.

	<b>PRETRATAMIENTO</b>	<b>HIDRÓLISIS</b>	<b>ART TOTALES</b>
<b>PRETRATAMIENTO</b>	<b>% ART</b>	<b>% ART</b>	<b>% ART</b>
<b>E+ Ácido acético</b>	1.00649	1.76175	2.76824
<b>E + Ca(OH)<sub>2</sub></b>	0.88419	1.52292	2.40712
<b>E + NaOH</b>	0.93605	1.60902	2.54507
<b>Sin pretratamiento</b>	3.45680		

De la tabla 7 se observan mejores porcentajes de ART si se utiliza el ácido acético glacial, sin embargo cuando se compara con el resultado obtenido con NaOH, la diferencia es menor al 0,1%, Por esta razón se decidió seguir realizando los experimentos con NaOH, además, este último es más accesible y sería adecuado para una posterior etapa de fermentación. Puesto que el ácido acético glacial es toxico, muy reactivo y su precio en comparación con el del hidróxido de sodio es mayor.

### **3.2.7 Hidrólisis realizada a la biomasa para cuantificación de azúcares residuales en el pretratamiento:**

Debido a que el objetivo del pretratamiento es extraer todos los azúcares presentes en la biomasa de microalgas, se realizó hidrólisis para hacer la cuantificación de los azúcares residuales en la etapa de pretratamiento, por lo tanto, la hidrólisis es solo un indicador para saber qué cantidad de azúcares no fue extraída en esta etapa ya que no se contaba con la caracterización de esta materia prima con respecto a su contenido en carbohidratos.

Es posible conseguir hasta un 98% de recuperación de los azúcares hemicelulósicos para maderas blandas, mediante la norma Lap-NREL/TP-510-

42618 (ver anexo E), por lo cual se consideró apropiado hacer la cuantificación de los azúcares residuales por este método.

Como referencia se hizo hidrólisis directa a la biomasa sin pasar por la etapa de pretratamiento a las dos especies de microalgas utilizadas, cuyos resultados se expresan en la tabla 8.

**Tabla 8:** Porcentajes de ART en la hidrólisis.

<b>Tipo de biomasa</b>	<b>% ART en la Hidrólisis</b>
<i>Ch. Gracilis</i> 150 ppm FeCl <sub>3</sub>	3.7742
<i>Ch. Calcitrans</i> 30 ppm FeCl <sub>3</sub>	6.4707

A pesar que la hidrólisis directa extrae parte de los azúcares contenidos en las microalgas, no nos permite cuantificar de manera exacta la cantidad de azúcares presentes, pues para las especies trabajadas según la literatura el contenido de carbohidratos es de 17%, mientras que el que se determinó por hidrólisis directa es menor al 7%.

### 3.3 Planeamiento experimental del pretratamiento.

#### 3.3.1 Diseño central compuesto circunscrito (CCC)

Se efectuó un diseño central compuesto circunscrito que comprende un diseño factorial 2<sup>3</sup>, tres puntos centrales y un punto estrella para cada variable. Las variables estudiadas fueron: Tiempo de reacción (min), Concentración de etanol (%v/v) y Concentración de NaOH (%p/p).

**Tabla 9:** Valores y niveles de las variables seleccionadas.

<b>VARIABLE</b>	<b>-0.682</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>+0.682</b>
Concentración de NaOH (%p/p)	0.318	1	2	3	3.682
Concentración de Etanol (%v/v)	1.364	15	35	55	68.63
Tiempo (min)	9.546	30	60	90	110.4

Los experimentos preliminares mostraron que se deben manejar pequeñas cantidades de NaOH y tiempos moderados para obtener mayores cantidades de ART en el pretratamiento. Una vez han sido seleccionados los rangos para cada variable, se obtiene el diseño experimental mostrado en la tabla 10, donde N muestra las diferentes condiciones para cada experimento del diseño.

**Tabla 10:** Diseño experimental obtenido para la etapa de pretratamiento y resultados de ART en el pretratamiento, hidrólisis y totales.

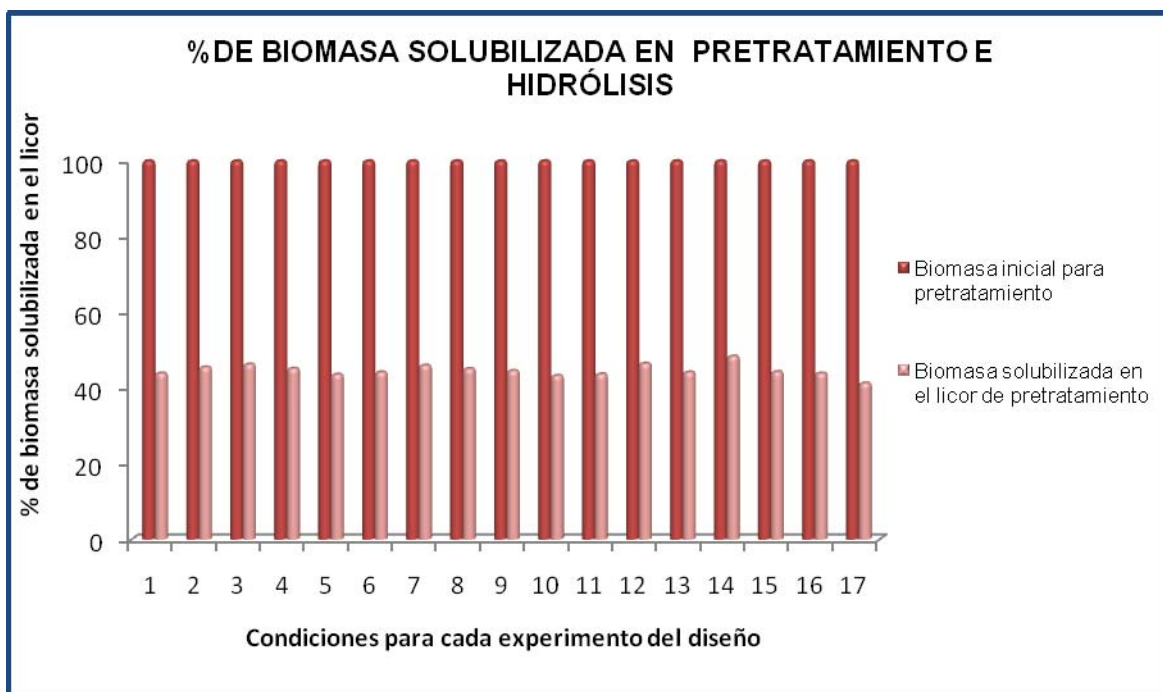
N	NaOH (%p/p)	Etanol (% v/v)	Tiempo (min)	% ART PRETRAT.	% ART HIDRÓLISIS	% ART TOTALES
1	1	15	30	0.386	1.947	2.333
2	1	15	90	<b>0.888</b>	<b>2.057</b>	<b>2.945</b>
3	1	55	30	0.742	2.222	2.799
4	1	55	90	0.367	2.474	2.841
5	3	15	30	0.226	2.035	2.261
6	3	15	90	0.384	1.967	2.351
7	3	55	30	0.371	2.052	2.423
8	3	55	90	0.415	1.748	2.163
9	0,318	35	60	0.649	1.715	2.364
10	3.682	35	60	0.419	1.913	2.332
11	2	1.364	60	0.207	1.641	1.848
12	2	68.636	60	<b>0.965</b>	<b>2.360</b>	<b>3.325</b>
13	2	35	9.546	0.263	1.560	1.823
14	2	35	110.45	0.568	1.994	2.562
15	2	35	60	0.547	2.292	2.839
16	2	35	60	0.494	1.867	2.361
17	2	35	60	0.480	2.099	0.480

En la tabla 10, se observa que la mayor liberación de ART en la etapa de pretratamiento fue la corrida N° 12 (2% NaOH, 68.636 % v/v de Etanol y 60 min), alta concentración de etanol y tiempo moderado, seguido por la corrida N° 2 (% NaOH, 15 % v/v de Etanol y 90 min) donde la concentración de etanol es mínima y el tiempo es alto.

Comparando la corrida N°1 con la N° 5 y la corrida N° 9 con la N° 10 se observa la influencia del NaOH en el pretratamiento, ya que a medida que aumenta el

porcentaje de soda disminuye la concentración de ART obtenidos. Comparando la corrida N°1 con la N° 3 para 30 min el porcentaje de ART es mayor cuando aumenta la concentración de etanol, pero al comparar la corrida N° 2 con la N° 4 para 90 min, se observa que la cantidad de ART aumenta cuando disminuye la concentración de etanol. Observando las corridas N°1 y la N°2 para una concentración de etanol de 15% v/v, el porcentaje de ART es mayor cuando aumenta el tiempo, pero en la corrida N°3 y N°4 hay un aumento de ART cuando se disminuye el tiempo, confirmándose la interacción entre el tiempo y el etanol.

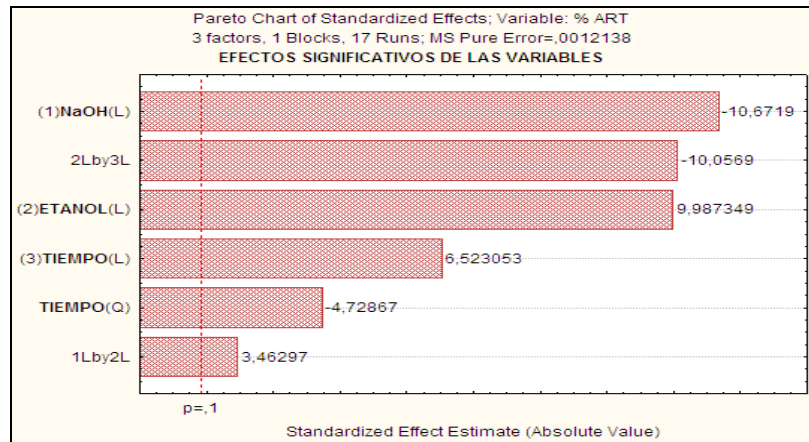
**3.3.2 Biomasa solubilizada en el licor:** Según el procedimiento descrito en la sección 2, se obtuvo el porcentaje de biomasa solubilizada en el licor de pretratamiento e hidrólisis. Se pudo observar que el pretratamiento que más solubilizó fue el 14 (2% p/p NaOH, 35% v/v y 110.45 min) con un porcentaje de 48.4%, el que menos solubilizó fue el pretratamiento 10 (3,682% NaOH, 35%v/v de etanol y 60 min) con un porcentaje de 43,3%. Observándose que a mayor tiempo, mayor cantidad de biomasa es solubilizada-



**Figura 10:** porcentaje de Biomasa resultante después del pretratamiento e hidrólisis para cada corrida realizada.

### 3.4. Efecto de las variables sobre el pretratamiento

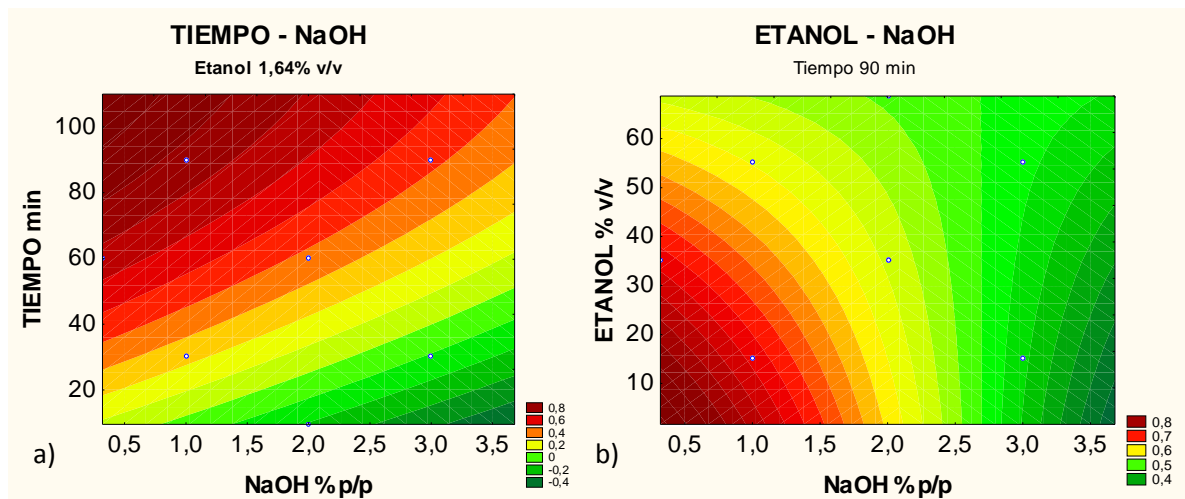
El programa utilizado para evaluar el diseño experimental fue STATISTICA 7.0, siendo la variable de respuesta el porcentaje de ART en el pretratamiento. Para poder visualizar cuales efectos tienen mayor impacto en la variable de respuesta, se graficó el diagrama de Pareto mostrado en la figura 11, donde se detectan los tres efectos más importantes causados por la concentración de NaOH, la concentración de etanol y la interacción entre el etanol y el tiempo (2Lb y 3L). El efecto más importante lo causa la concentración de NaOH que produce una reducción en la extracción de ART, el efecto del tiempo y la concentración de etanol, no se pueden interpretar separadamente debido a la existencia de la interacción entre ellos.



**Figura 11:** Gráfico pareto de los efectos estándares teniendo como variable respuesta: ART del pretratamiento.

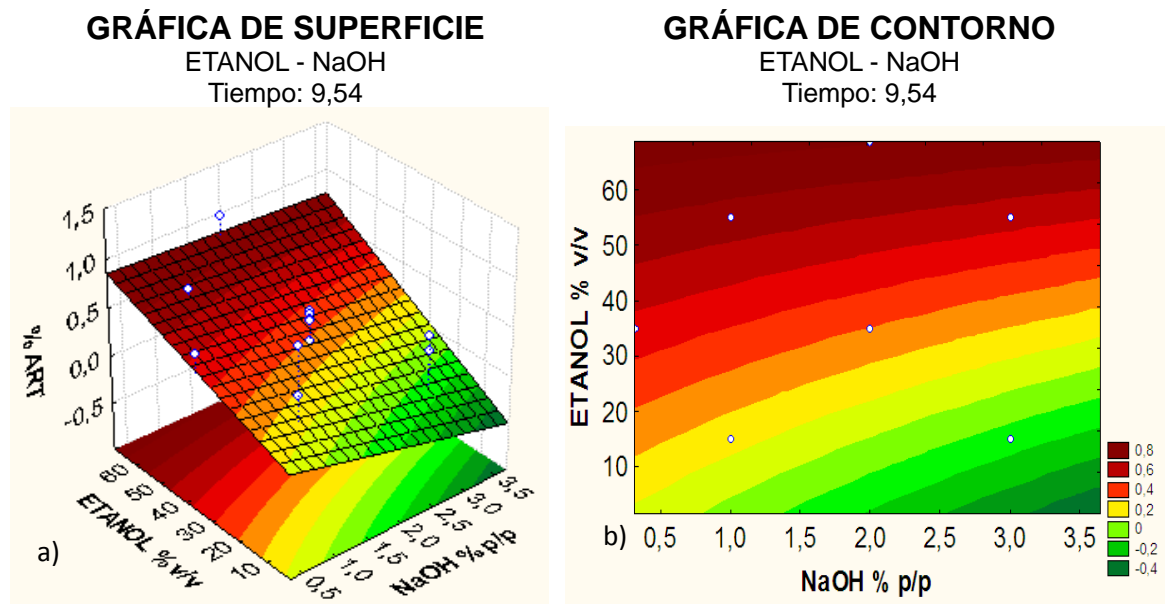
### 3.4.1. Efecto del NaOH en el pretratamiento

En el diagrama de Pareto presentado en la figura 11 se observa que el NaOH presenta el mayor efecto siendo este negativo para la obtención de ART en el pretratamiento, esto se debe a que en NaOH causa reacciones de despolimerización terminal degradando los carbohidratos presentes en la microalga. En la figura 11 se puede observar con claridad la tendencia general del NaOH en el pretratamiento, ya que la mayor cantidad de azúcares reductores liberados, denotados por las zonas rojas suceden por debajo del 1% de NaOH.



**Figura 12:** Curvas de nivel mostrando el efecto de NaOH en el pretratamiento: a) Gráfico Tiempo vs NaOH a 1,64% v/v de etanol b) Gráfico etanol vs NaOH a 90 min de reacción.

Sin embargo en el mismo diagrama de Pareto (figura 11) se observa una interacción entre el NaOH y el etanol (denotados por 1Lb y 2l) la cual tiene un efecto positivo en el pretratamiento, lo que indica que el NaOH no se debería eliminar en su totalidad del pretratamiento, pues es posible que el NaOH cause una desestabilización en la membrana, debido a que la especie trabajada (*Ch. Calcitrans*) posee un frústulo compuesto de sílice la cual es soluble en álcalis fuertes con el NaOH, lo que facilitaría la liberación de azúcares contenidos en la microalga. Lo anterior sugiere se debe realizar el pretratamiento utilizando concentraciones bajas de NaOH, menores a 0.5% p/p, permitiendo de esta manera el rompimiento de la membrana celular y evitando la degradación de carbohidratos.

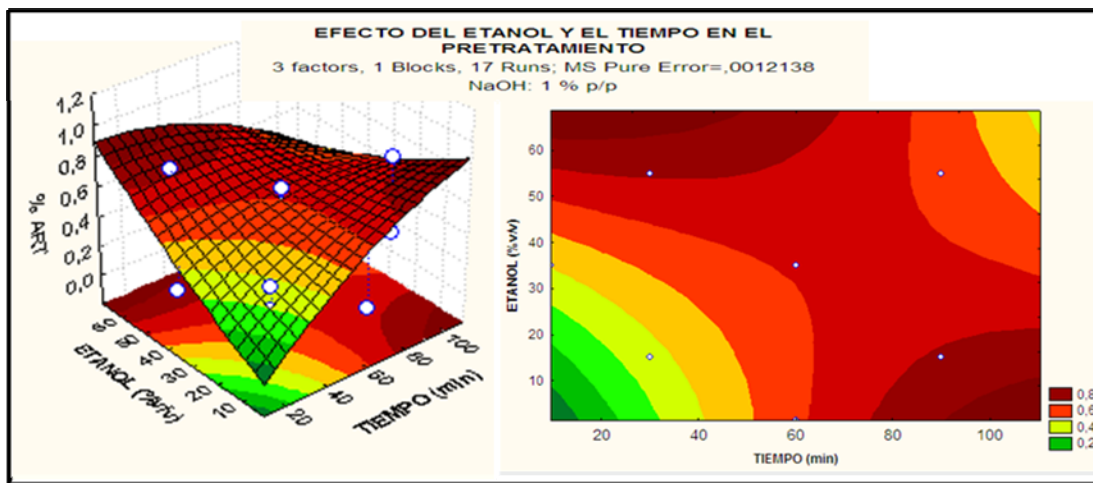


**Figura 13:** Efecto del Etanol y el tiempo en el pretratamiento: a) Gráfico de superficie para etanol vs NaOH para un tiempo de 9,54 min b) Gráfico de superficie para el etanol vs NaOH a 9,54 min de reacción.

### 3.4.2. Efecto del etanol y tiempo en el pretratamiento.

El efecto del etanol y el tiempo no se puede analizar por separado puesto que hay una fuerte interacción entre estas variables tal como lo muestra el diagrama de Pareto (figura 11) en donde el efecto entre estas dos variables se muestran como el segundo más importante en el diagrama.

La interacción entre el etanol y el tiempo se puede ver claramente en la figura 13 donde se observa la superficie y curva de nivel con un comportamiento similar a un punto de silla, por presentar dos regiones con mayor liberación de azúcares representadas por las zonas de color rojo, y a su vez, mostrando dos zonas con poca liberación de azúcares de color verdes en la misma grafica, esta zonas verde muestra la interacción entre el etanol y el tiempo que tiene un efecto negativo para el pretratamiento, tal como lo muestra la segunda barra del diagrama de Pareto.



**Figura 14:** Superficie y curva de nivel de la concentración de NaOH en el pretratamiento.

### 3.5. Región óptima para el pretratamiento

En el diseño central compuesto se presenta dos regiones con altas liberaciones de ART en la figura 14, las cuales muestran que para mejorar el pretratamiento se necesitan tiempos cortos y una alta concentración de etanol o tiempos largos y

una baja concentración de etanol, además, también se puede ver (tablas 9,10 y 11) que se necesitan concentraciones mínimas de NaOH para ambos casos. Debido a lo anterior se hicieron los experimentos mostrados en la tabla 12 con el fin de encontrar el óptimo experimental.

**Tabla 12:** Resultados obtenidos para los puntos óptimos en la etapa de pretratamiento.

<b>Nº</b>	<b>NaOH</b>	<b>Etanol</b>	<b>Tiempo</b>	<b>% ART</b>	<b>% ART</b>	<b>% ART</b>
<b>A</b>	<b>0.318</b>	<b>80</b>	<b>20</b>	<b>2.705</b>	<b>1.689</b>	<b>4.394</b>
B	0.318	100	20	2.504	1.798	4.302
C	0.318	0	120	0.934	2.982	3.916
D	0.318	20	120	1.114	2.766	3.880

De los resultados de la tabla 12 se puede deducir que es recomendable pretratar con 0.318 %p/p de NaOH y 80 % v/v de Etanol durante 20 min de reacción para alcanzar una liberación de 4.394% de ART. Al comparar este porcentaje con el obtenido mediante la hidrólisis directa en la biomasa (6.4707%), se observa que el rendimiento del pretratamiento es del 68%.

El porcentaje de etanol necesario para hacer el pretratamiento es considerablemente alto (de un 80%), lo que hace poco viable en pretratamiento, sin embargo el etanol podría recircularse disminuyendo los costos del proceso.

## CONCLUSIONES

Se elaboró un método de pretratamiento para lograr la extracción de azúcares reductores a partir de microalgas, como vía a una posterior fermentación para la obtención de bioetanol, esto se dió a través de la experimentación, buscando la mejor alternativa que redujera las pérdidas de masa y lograra la mayor eficiencia del proceso utilizando los materiales al alcance.

A través de los experimentos realizados en el pretratamiento álcali-etanol, se comprobó el efecto negativo que tiene altas concentraciones de NaOH, ya que este degrada los carbohidratos presentes en la microalga. Se mostró que la mejor concentración de NaOH para realizar pretratamiento es de 0.318%p/p, siendo la mínima cantidad de Hidróxido de Sodio adicionada en el pretratamiento.

El análisis estadístico evidenció dos regiones con altas concentraciones de ART en los puntos extremos cuando se analiza las variables tiempo y etanol. Esta interacción presenta un efecto positivo en el pretratamiento cuando se trabajan tiempos cortos y altas concentraciones de etanol y por otra parte, cuando se trabaja a bajas concentraciones de etanol y altos tiempos de reacción. En el estudio de las dos regiones con altas liberaciones de ART se encontró que se obtienen mejores resultados con una alta concentración de etanol y tiempos cortos (80 % v/v de etanol, 20 min, 0.318%p/p de NaOH).

La eficiencia del proceso es 68% al comparar los porcentajes de ART del pretratamiento con los obtenidos en la hidrólisis directa a la biomasa. Debido a que no se contó con la caracterización exacta de la biomasa respecto a su contenido de carbohidratos, se tomó como referencia la hidrólisis directa para determinar la eficiencia del pretratamiento.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda estudiar la influencia de temperatura y presión en el pretratamiento, utilizando un reactor que permita alcanzar altas presiones y temperaturas, que puede lograr a su vez una mayor efectividad del etanol en el pretratamiento.

Recircular el etanol utilizado durante el pretratamiento con el fin de que el proceso sea viable.

Utilizar otros tipos de microalgas que no contengan frústula en su pared celular, además que tengan un alto contenido de carbohidratos, permitiendo aplicar un pretratamiento con condiciones suaves, donde se minimicen los costos de producción, haciendo viable la producción de etanol a partir de microalgas.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] CARDONA, V, Villada, (2006, Abril), Biocombustibles fuentes agotables o inagotables de energía. Recuperado el 18 de Noviembre de 2009 < <http://www.atinabiotec.cl>>.

[2] MEDINA, Juan J. (2008, Marzo). Principales insumos en la producción de biocombustibles. Recuperado el 23 de Octubre de 2009. < <http://www.inta.gov.ar/>>

[3] BIODISOL, Promueven el cultivo de microalgas para la producción de Biocombustibles, Recuperado el 15 de Noviembre de 2009. < <http://www.biodisol.com/>>

[4] SINC, Utilizan las microalgas como fuente de energía alternativa. Recuperado el 10 de Diciembre de 2009. < <http://www.plataformasinc.es/>>

[5] UEDA, Ryohei, HIRAYAMA, Shin, SUGATA, kiyoshi, NAKAYAMA Hiroshi, Process for the production of ethanol from microalgae, United States Patents, Numero 5,578,472, Noviembre 26 de 1996.

[6] SANCHEZ M, Jose I, Expectativas del sector de la bioenergía en Castilla y León. Recuperado el 9 de Noviembre de 2009. < <http://www.cescyl.es> >

[7] KRAUSS, Robert, Mass culture of algae for food and other organic compounds. American Journal of Botany, Vol. 49, No. 4 (Apr., 1962), pp. 425-435

[8] MOORE, Jesse, (2009, marzo), Microalgae: from Biodiesel to Bioethanol and Beyond, Recuperado el 20 de Diciembre de 2009. < <http://snrecmitigation.wordpress.com> >

[9] MICROALGAE, Base de datos de microalgas. [Base de datos en línea]. [Consultado el 05 Ene.2010]. Disponible en <<http://algaebase.org/>>.

- [10] BAND S, Christine J. Efecto de la composición bioquímica de microalgas sobre el valor nutritivo de dos cepas de *Artemia*. La Paz, 1999, 23 p. Tesis (Magíster en Ciencias). Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- [11] BILL, Harding. Diatoms Hardcopy Taxonomic Key, Editorial Academic Press, 2003, 178 p.
- [12] BROWN, M.R, JEFFREY,S.W y GARLAND C.D,” Nutricional Aspects os Microalgae used in Maniculture: a Literature Review. Csiro Marine Laboratories.1989:5-6.
- [13] BROWN, M.R, JEFFREY, S. W, VOLKMAN, J.K., DUNSTAN, G.A, Nutritional properties of microalgae for mariculture, *Aquaculture*, 151. (1997): 315-331.
- [14] OCLETO O, Cesar y ZÚÑIGA A, Reina, Introducción a las algas. Lima: Editorial Escuela Nueva S.A, 1998.
- [15]SÁNCHESES, O y CARDONA C, Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, No 30. 2005. pp 671-678.
- [16] SIALVE, B; BERNET N; BERNARD, O, Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology advances*. Elsevier. 2009.
- [17] JANCZYK, P., FRANKE, H., SOUFFRANT, W.B. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Animal feed science and technology* Elsevier,132. (2007): 163–169.
- [18] BOUGRIER, C., ALBASI, C., DELGENÈS, J.P., CARRÈRE, H. Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge

solubilisation and anaerobic biodegradability. Chemical Engineering and processing. 45. (2006):711–718.

[19] MARTON, R ; GRANZOW.S. Ethanol-alkali pulping. Tappi. 65 (6). 1982. P 103-106.

[20] MELO. R, y MONTOYA, W.. Pulpaje soda – etanol de madera de eucalipto. Celulosa y papel. Celulosa y Papel, 1986,Vol 2 Nº 1, 13-15.

[21] UNIVERSIDAD DE SONORA, Red institucional bibliotecaria [Pagina web]. [Consultada el 12 Dic. 2009]. Disponible en <<http://www.biblioteca.uson.mx/>>.

[22] UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA. [Pagina web]. [Consultada el 6 Ene. 2010]. Disponible en <<http://docencia.izt.uam.mx/>>.

[23] OLIVA D, Jose M. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión de vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. España. Tesis (Doctor). Universidad complutense de Madrid. Departamento de microbiología. Facultad de ciencias biológicas. 2003.

[24] GUTIÉRREZ, Humberto, SALAZAR, Román. Análisis y diseño de experimentos. Segunda edición. México: Mc Graw Hill, 2004. 384-420 p.

[25] BOX, George, HUNTER, William, HUNTER, Stuart. Estadística para investigadores: Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Primera edición. Barcelona: Reverté, 1989. 525-550 p.

[26] FERNANDEZ, Carmen D, PIÑEIRO, Montserrat, Superficies de respuesta.

[27] SCKOETER, Martin C., Possible lignin reactions in the Organocell pulping process, Tappi Journal, 1999.

[28] STATSOFT, Statistica (Programa de Computador): Versión 7.0

**ANEXO A. COMPOSICIÓN DEL MEDIO f/2**  
**(Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975)**

Este es un medio común y ampliamente utilizado en agua de mar, diseñado para el cultivo de algas costeras. La concentración de la formulación original, llamada f (Guillard y Ryther 1962), se ha reducido a la mitad (Guillard 1975). El medio original (Guillard and Ryther 1962) uso secuestreno férrico, en este caso se usa Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O and FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O. En 950 ml de agua de mar natural filtrada, agregar los siguientes componentes. Llevar el volumen final a 1 litro con agua de mar natural filtrada. Autoclave. Si el silicato no es necesario dejar de reducir la precipitación.

**Tabla 13:** Componentes del medio f/2.

<b>Componente</b>	<b>Solución Stock (g·L<sup>-1</sup> dH<sub>2</sub>O)</b>	<b>Cantidad utilizada</b>	<b>Concentración en el medio final</b>
NaNO <sub>3</sub>	75	1 mL	8.82 x 10 <sup>-4</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5	1 mL	3.62 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	30	1 mL	1.06 x 10 <sup>-4</sup>
Traza de metales en solución	Vea la tabla 14	1 mL	–
Vitaminas en solución	Vea la tabla 15	0,5 mL	–

**Tabla 14:** Traza de metales en solución en el medio f/2.

<b>Componente</b>	<b>Solución Stock (g·L<sup>-1</sup> dH<sub>2</sub>O)</b>	<b>Cantidad utilizada</b>	<b>Concentración en el medio final</b>
FeCl <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	–	3.15 g	1.17 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	–	4.36 g	1.17 x 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180.0	1 mL	9.10 x 10 <sup>-7</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22.0	1 mL	7.65 x 10 <sup>-8</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10.0	1 mL	4.20 x 10 <sup>-8</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	9.8	1 mL	3.93 x 10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6.3	1 mL	2.60 x 10 <sup>-8</sup>

En los **950 mL** de dH<sub>2</sub>O, disolver el EDTA y otros componentes. Llevar el volumen final a 1 L con dH<sub>2</sub>O.

**Tabla 15:** Solución de vitaminas en el medio f/2.

<b>Componente</b>	<b>Solución Stock (g·L<sup>-1</sup> dH<sub>2</sub>O)</b>	<b>Cantidad utilizada</b>	<b>Concentración en el medio final</b>
Tiamina·HCl (vitamina B1)	–	200 mg	$2.96 \times 10^{-7}$
Biotin (vitamina H)	1.0	1 mL	$2.05 \times 10^{-9}$
Cyanocobalamin (vitamina B12)	1.0	1 mL	$3.69 \times 10^{-10}$

En los 950 ml de dH<sub>2</sub>O, disolver el clorhidrato de tiamina ·HCl, y añadir 1 ml de la solución stock primaria. Llevar el volumen final a 1litroscon dH<sub>2</sub>O. Filtrar-esterilizar y almacenar congelados.

## ANEXO B. CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

La caracterización de la biomasa fue realizada por El Instituto Colombiano del Petróleo (ICP). Se trabajaron con tres especies de *Chaetoceros* sp. : *Ch. gracilis* (diez días de cultivo), *Ch. calcitrans* (tres días de cultivo) y *Ch. gracilis* (tres días de cultivo).

**Tabla 16:** Análisis efectuados sobre las muestras de *Ch. gracilis* (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de  $\text{FeCl}_3$ , por El Instituto Colombiano de Petróleo (ICP)

Análisis	Resultado
%Humedad	13.3
%Cenizas	59.88
%Bulk, Roca total	NaCl, $\text{CaCl}_2$
%Proteína	9.88
%Nitrógeno	1.52
%Silicio	4.64
%Hierro	43.07
%Calcio	0.7264
%Perdidas a 525 C-CL	37.75

**Tabla 17:** Análisis efectuados sobre las muestras de *Ch. gracilis* (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de  $\text{FeCl}_3$ , por La Universidad de Antioquia (UDEA)

Análisis	Resultado
%Humedad	11.53
%Cenizas	61.74
%Carbohidratos	17.27
%Proteína	9.39
%Nitrógeno	1.502
%Grasa	0.061
%Calorías	107.2
%Fibra bruta	0.18

**Tabla 18:** Análisis efectuados sobre las muestras de *Ch. gracilis* (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de FeCl<sub>3</sub>, en el laboratorio

<b>Análisis</b>	<b>Resultado</b>
%Humedad	14.85
%Cenizas	44.92
% Lípidos	1.23

**Tabla 19:** Análisis efectuados sobre las muestras de *Ch. calcitrans* (tres días de cultivo) floculada con 30 ppm de FeCl<sub>3</sub>, en el laboratorio

<b>Análisis</b>	<b>Resultado</b>
%Humedad	8.46
%Cenizas	40.67
% Lípidos	3.25
% carbohidratos	6.47

**Tabla 20:** Análisis efectuados sobre las muestras de *Ch. gracilis* (tres días de cultivo) floculada con 30 ppm de FeCl<sub>3</sub>, en el laboratorio

<b>Análisis</b>	<b>Resultado</b>
%Humedad	5.66
%Cenizas	58.83
% Lípidos	2.38
% carbohidratos	5.29

## ANEXO C. REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.

**Tabla 21:** Reactivos usados.

Reactivo	Fórmula Molécul ar	Fabricante	Peso molecular (g/mol)	Pureza
Ácido acético glacial	$C_2H_4O_2$	Merck	60,05	99,7
Ácido dinitro-3,5- salicílico	$C_7H_4N_2O_7$	Merck	228,12	99
Ácido sulfúrico	$H_2SO_4$	Merck	98,08	95-97
Antraquinona	$C_6H_4COC_6H_4CO$		208,22	98
Carbonato de calcio	$CaCO_3$	Merck	100.087	98-99
Etanol	$C_2H_6O$	Mallinckrodt chemicals	46.07	99.7
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	Merck	180,16	99,7
Hexano	$C_6H_{14}$	Mallinckrodt chemicals	86,18	98.5
Hidróxido de calcio	$Ca(OH)_2$	Merck	74,09	
Hidróxido de sodio	$NaOH$	Merck	39,98	99
Papel filtro	-	Munktell	-	-
Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado	$KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	Merck	282,22	95

## ANEXO D. PREPARACIÓN DE LA HIDRÓLISIS

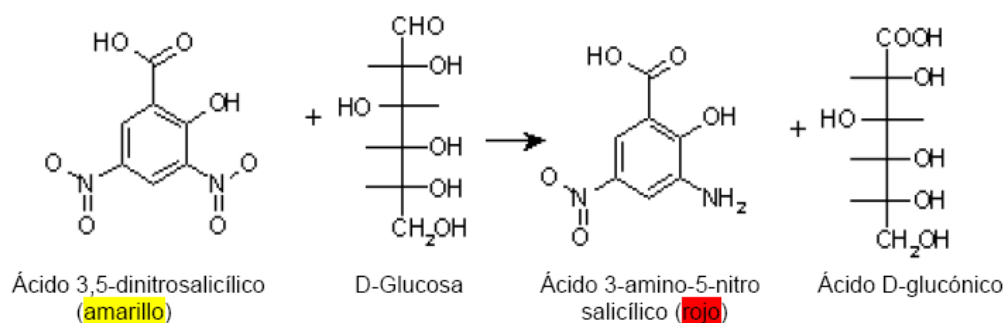
Para determinar los carbohidratos luego del pretratamiento se utilizó la norma Lap-NREL/TP-510-42618, la cual fue adaptada para la biomasa de microalgas. En base a esta norma, se pesó 1 g de muestra y se colocó en un tubo de ensayo debidamente rotulado. A esta muestra se le adicionó 10 mL de ácido sulfúrico al 72% v/v, inmediatamente se colocó en un baño de agua a 30°C durante 1 hora, tiempo durante el cual la muestra se agitó cada 10 min para homogenizar el contenido.

Después de completada esta parte de la hidrólisis se diluyó el ácido sulfúrico a una concentración del 4 % agregando 280mL de agua des-ionizada usando una probeta, este contenido se colocó en erlenmeyer de 300 mL, se tapó con papel aluminio y se introdujo en una autoclave durante 1 hora a 120 °C y 2 atm. Completado el tiempo en la autoclave el erlenmeyer su contenido se dejó reposar hasta alcanzarla temperatura de laboratorio.

Se tomó una alícuota del licor de hidrólisis, la cual fue neutralizada con carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) hasta alcanzar un pH entre 5 y 6. El líquido neutralizado se utilizó para determinar el contenido de carbohidratos presentes utilizando el método descrito en el anexo G.

## ANEXO E. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES (ART).

La determinación de ART se realizó por medio del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-570 nm. La reacción que ocurre durante la determinación de azúcares es la siguiente:



**Figura 15:** Reacción para la cuantificación de azúcares reductores totales.

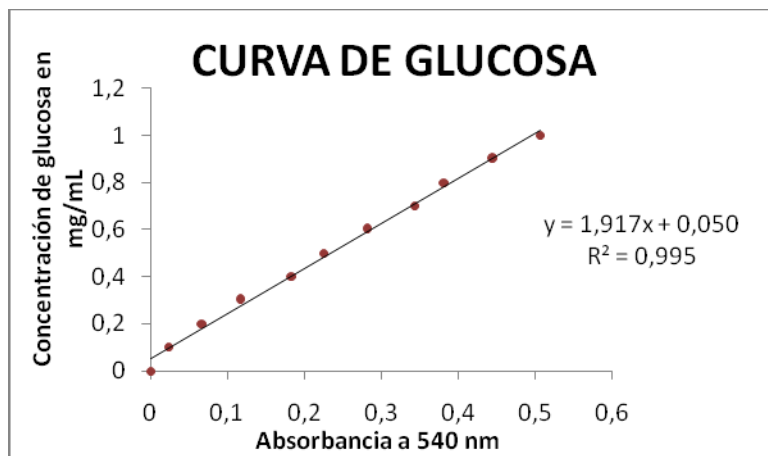
Para la preparación de 1L reactivo DNS, se tomo un vaso de precipitado forrado con aluminio, en el cual se calentaron 400 mL de agua a 50° C y le adiciono lentamente 10 g de DNS. Adicionalmente se preparo una solución básica con 16 g de NaOH y 200 mL de agua. La solución básica se mezcló en el vaso con la solución de DNS y se le adicionó 300 g de tartrato de sodio y potasio, esta mezcla se aforo completando los 1000 mL. Se dejó reposar y se almacenó en un frasco ámbar.

## ANEXO F. CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA GLUCOSA PARA EL REACTIVO DNS

En la construcción de la curva de glucosa se utilizó el método DNS descrito en el anexo E. Inicialmente se preparó una solución de glucosa con concentración de 1 mg/mL, en tubos de ensayos se colocaron muestras diluidas de 0,5 mL con concentraciones desde 0 a 1 mg/mL. Se hizo reaccionar cada una de las muestras en los tubos con 0,5 mL de reactivo DNS. Terminada la reacción fueron leídas en el espectrofotómetro, obteniéndose absorbancia para cada concentración de glucosa, tal como se observa en la tabla. Se graficaron los datos de concentración contra los de absorbancia para cada muestra, obteniéndose una línea recta con ecuación:  $[Glucosa] = 1,917*(Abs) + 0,050$ .

**Tabla 22:** Absorbancia para diferentes concentraciones de glucosa, después de la reacción con DNS.

[Glucosa]	Absorbancia	[Glucosa]	Absorbancia
0	0	0,6	0,2817
0,1	0,0237	0,7	0,3433
0,2	0,0677	0,8	0,3823
0,3	0,1167	0,9	0,4453
0,4	0,1843	1	0,5060
0,5	0,2253		



**Figura 16:** Curva de glucosa.

## ANEXO G. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD DE LAS MICROALGAS.

Para la determinación de la humedad se utilizó como referencia la norma para la determinación de sólidos totales (NREL/TP-510-42621), en la cual se sugería tomar 2 g de biomasa, los cuales eran colocados en crisoles con peso conocido y previamente secados a 105°C durante 4 h. La biomasa contenida en los crisoles era llevada a la estufa en la cual se secaba a 105°C durante mínimo 4 horas. Pasado este tiempo las muestras se retiraban del horno y se llevaban a un desecador hasta que alcanzara temperatura ambiente. Se les tomó el peso de cada una de las muestras y se llevaron nuevamente al horno durante 1 hora. Este procedimiento se repitió hasta que la variación entre los pesos tomados fuera más o menos del 0,1%.

Para el cálculo de la humedad teórica en la muestra se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{H. T. \%} = \frac{(W_{\text{Biomasa húmeda}} - W_{\text{Biomasa seca}})}{W_{\text{Biomasa húmeda}}} \times 100$$

**Tabla 23:** porcentaje de humedad de la Chaetoceros Calcitrans 30 PPM FeCl3.

Masa de microalgas húmedo (g)	Masa de microalgas seco (g)	% de microalgas seco	% de humedad
2,0008	1,8387	91,8982	8,1017
2,0008	1,8103	90,4788	9,5211
2,0018	1,8435	92,0921	7,9078
2,0009	1,8255	91,2339	8,7660
2,0010	1,8363	91,7691	8,2308
Media		91,4944	8,5055

**Tabla 24:** porcentaje de humedad de la *Ch. Gracilis* 150PPM FeCl<sub>3</sub>.

Masa de microalgas húmedo (g)	Masa de microalgas seco (g)	% de microalgas seco	% de humedad
2.001	1.7001	91,8982	15.0374
2.000	1.700	90,4788	15.001
2.000	1.7100	92,0921	14,5
Media		91,4944	14.8461

## ANEXO H. DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN LAS MICROALGAS

(CONTENIDO DE CENIZAS (LAP005) (NREL/TP-510-42622))

La ceniza estructural es material inorgánico que está enlazado a la estructura física de la biomasa. Para realizar la prueba de cenizas fue necesario secar hasta peso constante las muestras. Estas muestras fueron colocadas en una mufla durante 8 horas a 550 °C, luego se este tiempo se dejaron reposar, se colocaron en un desecador durante 1 hora. La ecuación para la determinación de cenizas fue:

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{(W_{\text{Biomasa seca}} - W_{\text{Cenizas}})}{W_{\text{Biomasa seca}}} \times 100$$

**Tabla 25:** Porcentaje de cenizas de la Chaetoceros Calcitrans 30 PPM FeCl<sub>3</sub> sin pretratamiento.

Masa de seca de microalgas	Masa cenizas (g)	% de cenizas
1.8327	1.0815	40.9897
1.8327	1.0928	40.3731
1.8334	1.1024	39.8734
1.8329	1.0729	41.4648
Media		40.6753

**Tabla 26:** Porcentaje de cenizas de la Chaetoceros Calcitrans 30 PPM PPM FeCl<sub>3</sub> con pretratamiento.

Masa de seca de microalgas	Masa cenizas (g)	% de cenizas
1.8402	0.7883	57.1632
1.8341	0.6722	63.3518
1.8377	0.8465	53.938
Media		58.1512

**Tabla 27:** Porcentaje de cenizas de la *Ch. Gracilis* 150 ppm FeCl<sub>3</sub>.

Masa de seca	Masa cenizas (g)	% de	Tipo de microalga
2.008	1.240	44.9156	<i>Ch. Gracilis</i> 150 ppm
2.001	1.1	52.8783	<i>Ch. Gracilis</i> 150 ppm

## ANEXO I. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS.

**Extracción soxhlet** : es una extracción sólido líquido, en la que se realiza un ciclo sin fin de extracciones de manera automática, con el mismo solvente que se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material. Mediante el lavado sucesivo de una mezcla, se puede extraer de ella componentes cuya solubilidad en el solvente es muy baja, debido al efecto acumulado de las múltiples extracciones.

La extracción Soxhlet se fundamenta en las siguientes etapas:

- 1) Preparación del montaje: Se prepara la muestra la cual se coloca en un cartucho y se coloca el solvente en un balón.
- 2) Ebullición del solvente: El solvente se evapora hasta un condensador a reflujo, luego el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior.
- 4) Ascenso del nivel del solvente: esto se debe a que el solvente se acumula en el extractor soxhlet, cubriendo el cartucho hasta un punto en el que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón.

Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón del solvente. Una vez terminado el tiempo de extracción, el solvente es recuperado y mientras que el material extraído es concentrado.

El proceso de extracción de la mayoría de las sustancias tiene muy baja eficiencia, es decir una vez que se agrega el solvente, lo que está en contacto íntimo con lo extraíble se satura enseguida, por lo que hay que filtrar y volver a tratar con solvente fresco. Eso implica gran cantidad y mucha manipulación del solvente aparte de la atención personalizada que la operación requiere. Como muchas veces lo que se quiere recuperar es el extracto y no la muestra extraída, habrá que evaporar todo el solvente para recuperarlo.

## ANEXO J. PORCENTAJES DE LIPIDOS EN LA MICROALGA

Para determinar la presencia de lípidos en la muestra se utilizó el método descrito en el anexo I. Para la extracción de la microalga *Ch. Gracilis 150PPM FeCl<sub>3</sub>* pretratada y sin pretratar, se utilizó un tiempo de extracción aproximadamente 5 g de muestra para un tiempo de extracción de 5 horas. El porcentaje de extracción se determinó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Lípidos extraídos} = \frac{(W_{\text{Biomasa seca}} - W_{\text{Biomasa extraída}})}{W_{\text{Biomasa seca}}} \times 100$$

**Tabla 28:** porcentaje de lípidos extraídos en la microalga *Ch. Gracilis 150PPM FeCl<sub>3</sub>*.

Tipo de biomasa	Masa inicial seca (g)	Masa final (g)	% de extracción de lípidos
Pretratada	4.88	4.855	0.51
Sin pretratar	4.626	4.569	1.23

Para la extracción de la microalga *Ch. calcitrans 30 ppm FeCl<sub>3</sub>* se utilizaron 10 g de muestra.

**Tabla 29:** Porcentaje de lípidos extraídos en la microalga *Ch. Calcitrans 30 ppm FeCl<sub>3</sub>*.

Tipo de biomasa	Masa inicial seca (g)	Masa final (g)	% de extracción de lípidos
Sin pretratar	9.16	8.8622	3.2510

## ANEXO K. ETAPAS DEL PROCESO

### BIOMASA

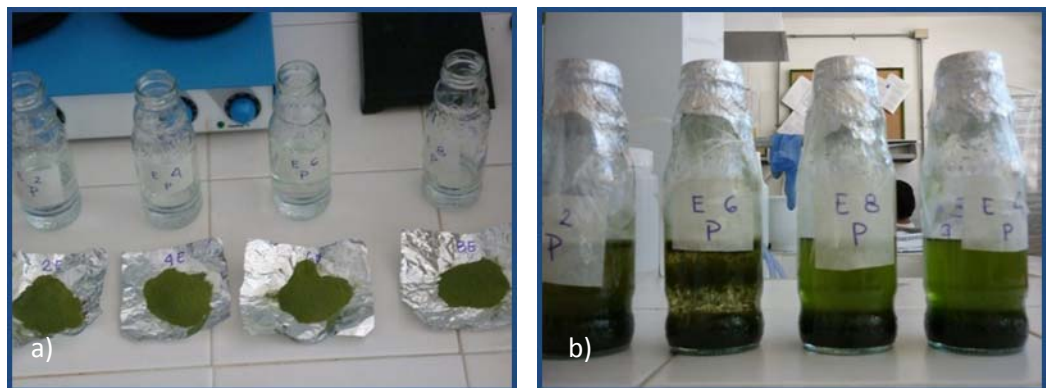


**Figura 17:** a) *Ch. Gracilis* 150 ppm de floculante  $FeCl_3$  macerada y sin macerar, b) *Ch. Calcitrans* 30 ppm de floculante  $FeCl_3$ .

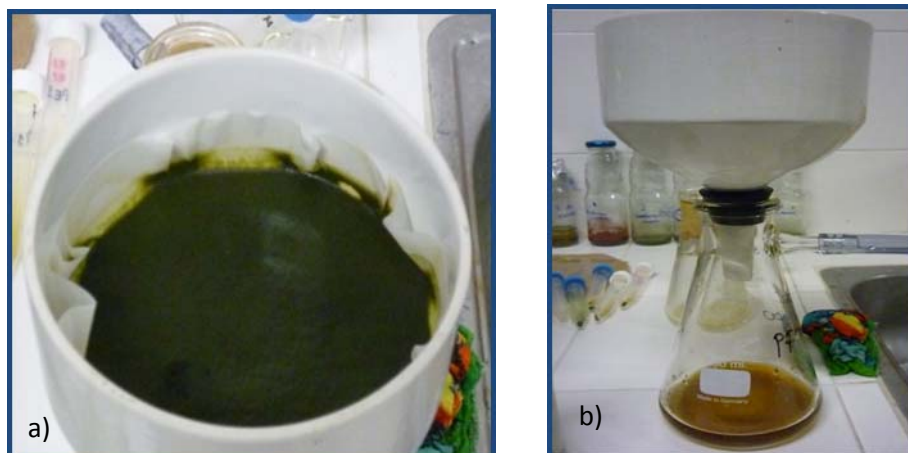


**Figura 18:** a) y b) Biomasa almacenada para planeamiento experimental

### PRETRATAMIENTO

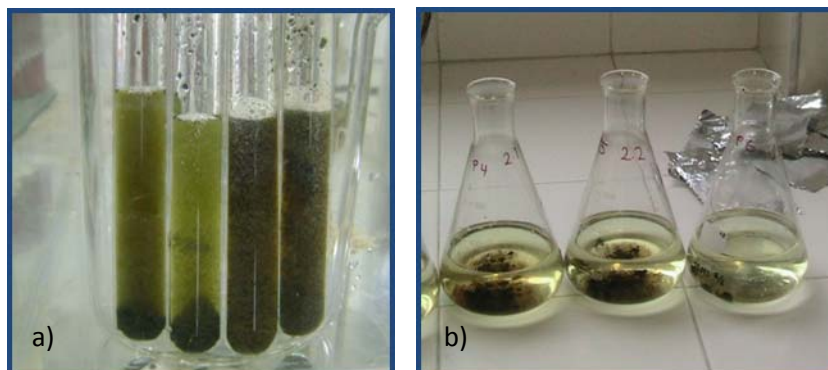


**Figura 19:** a) y b) licor y biomasa de pretratamiento antes autoclavar.  
**LAVADO Y SECADO**



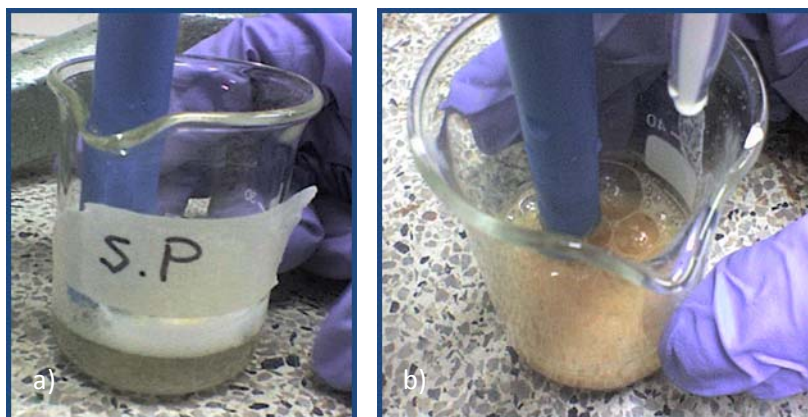
**Figura 20:** a) y b) Montaje para filtración al vacío.

## HIDRÓLISIS



**Figura 21:** a) Primera etapa de la hidrólisis, b) Segunda etapa de hidrólisis.

## NEUTRALIZACIÓN



**Figura 22:** a) y b) Neutralización de licor de hidrólisis con  $\text{CaCO}_3$ .

## DETERMINACIÓN DE ART.



Figura 23: a) y b) Método DNS para cuantificación de ART.

## CENIZAS

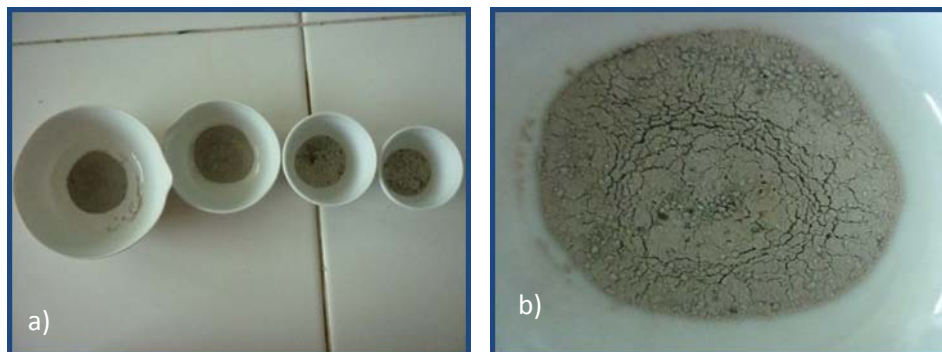


Figura 24: a) y b) Cenizas de la microalgas *Ch. calcitrans*.

## EXTRACCIÓN



Figura 25: a),b) Montaje soxhlet para la extracción de lípidos en la muestra

### ANEXO L: GRÁFICAS DE SUPERFICIE Y DE CONTORNO

### GRÁFICAS DE SUPERFICIE Y DE CONTORNO ETANOL VS NAOH

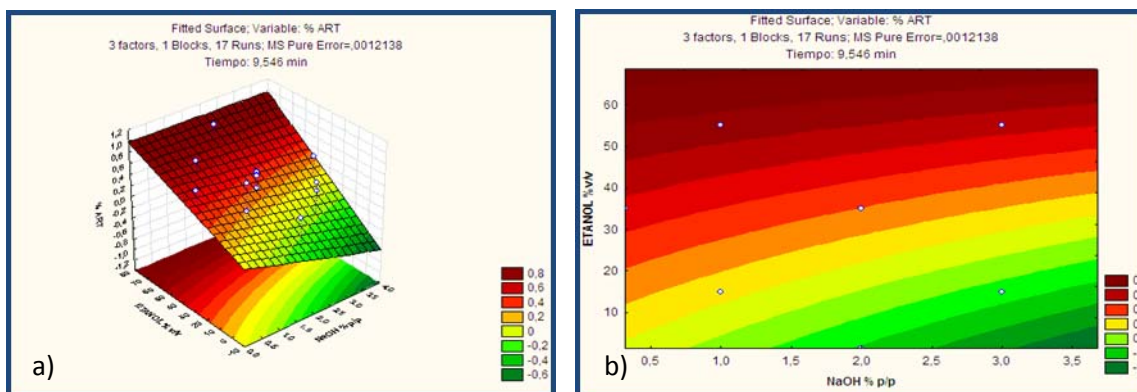


Figura 26: Tiempo 9.545 min, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.

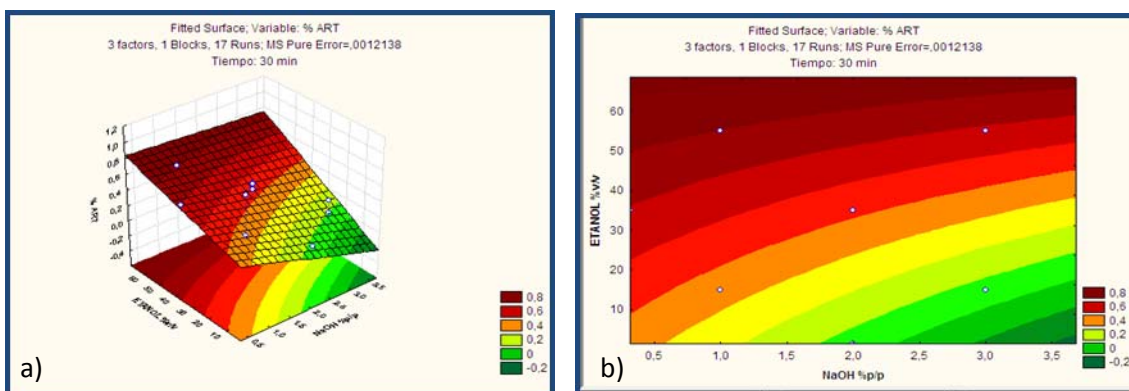
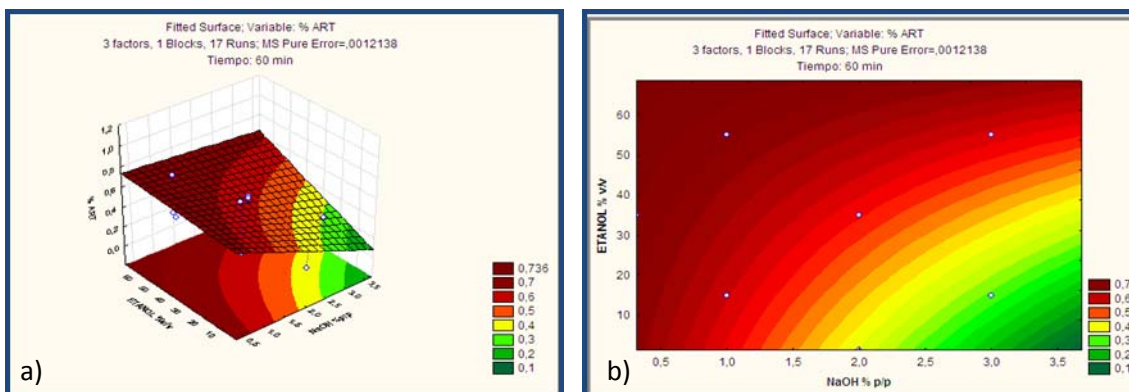
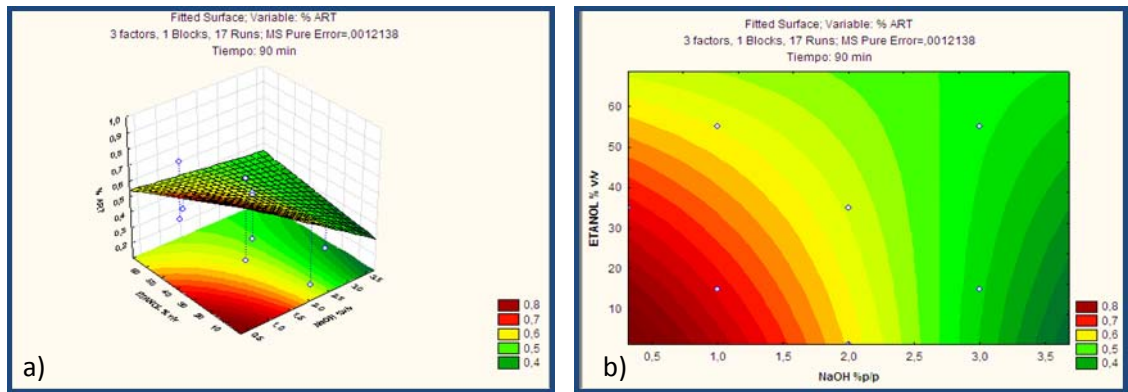


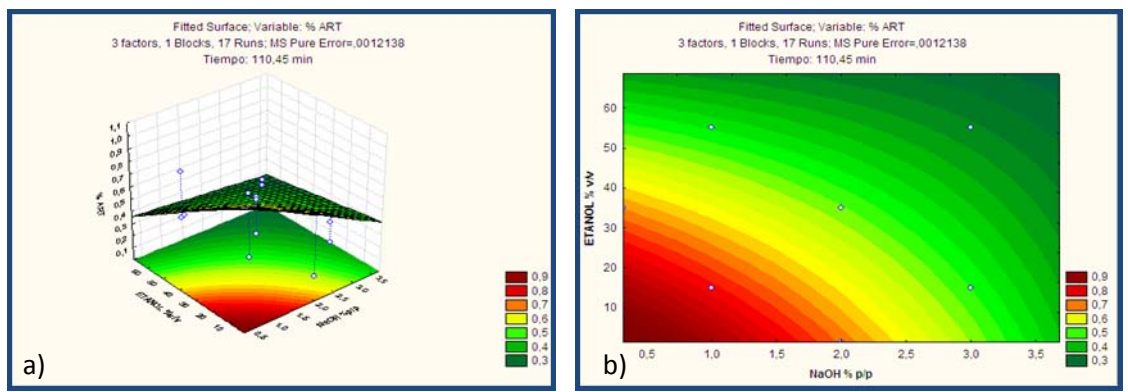
Figura 27: Tiempo 30 min, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.



**Figura 28:** Tiempo 60 min, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.



**Figura 29:** Tiempo 90 min, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.



**Figura 30:** Tiempo 110 min, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.

## GRÁFICAS DE SUPERFICIE Y DE CONTORNO TIEMPO VS NAOH.

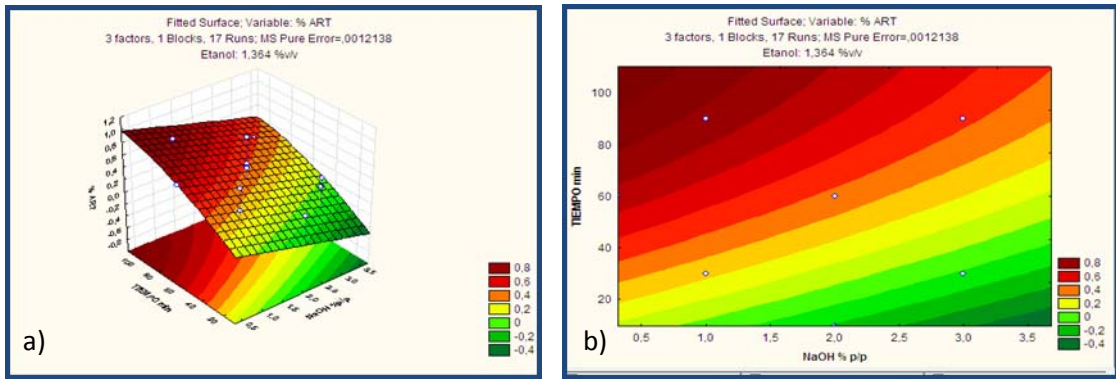


Figura 31: Etanol 1.368 % v/v, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.

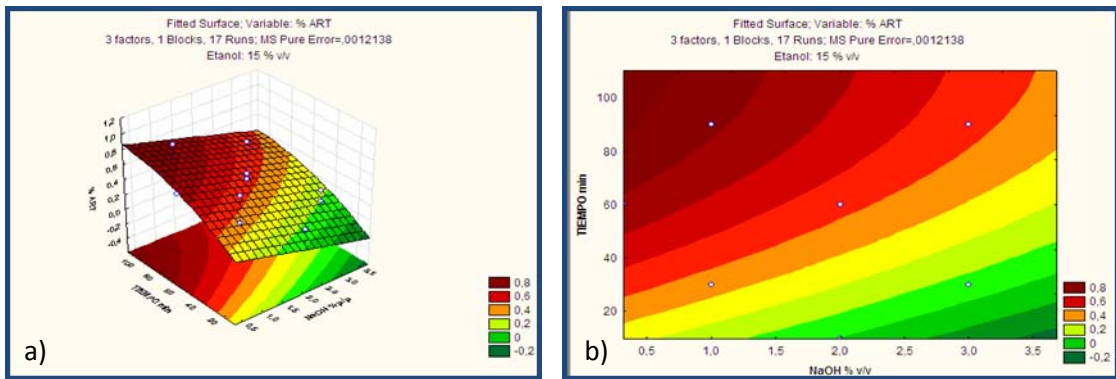


Figura 32: Etanol 15 % v/v, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.

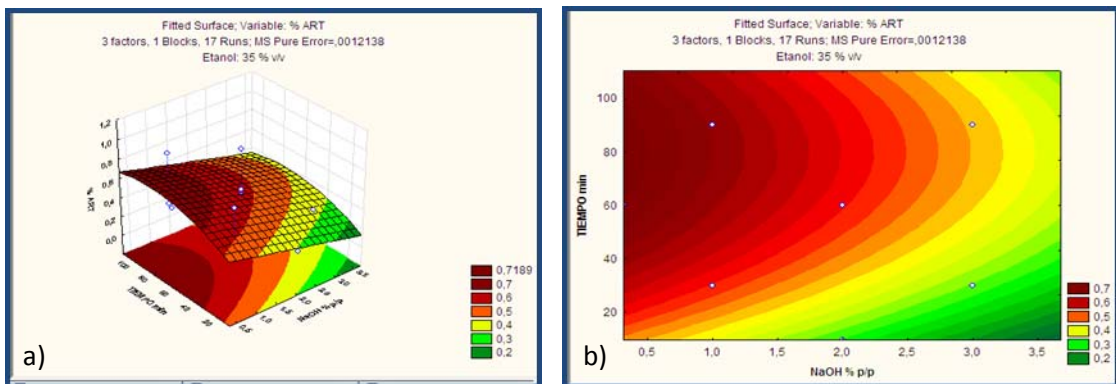


Figura 33: Etanol 35 % v/v, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.

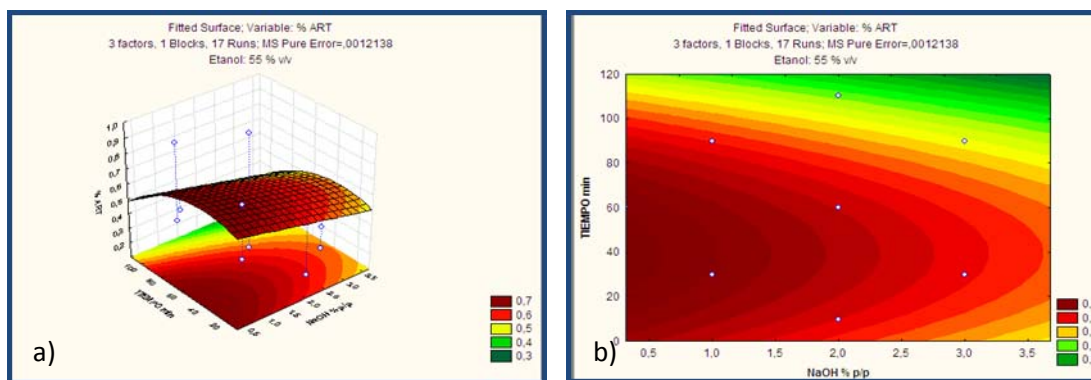


Figura 34: Etanol 55 % v/v, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.

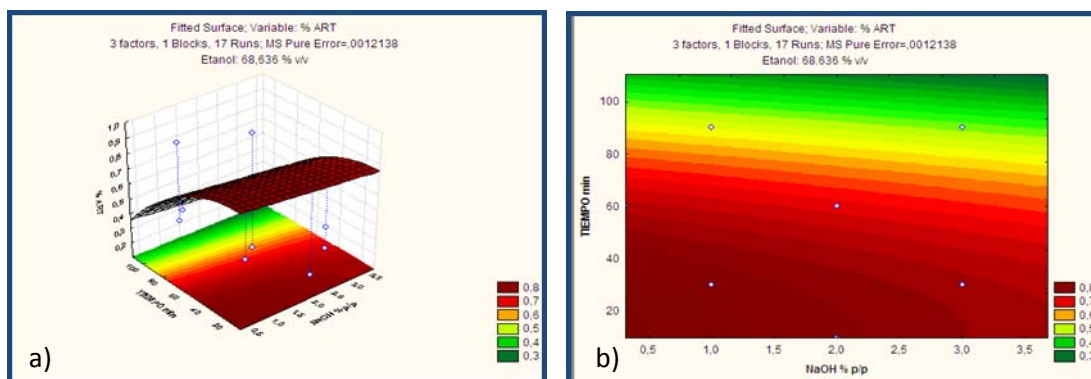
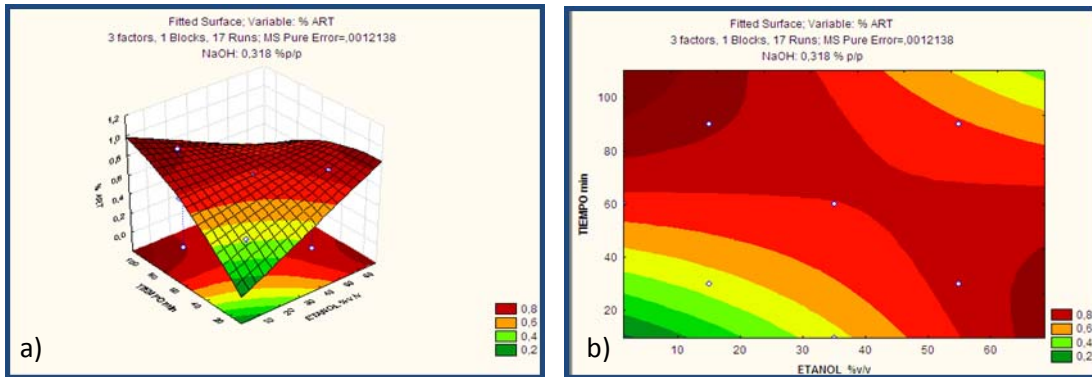
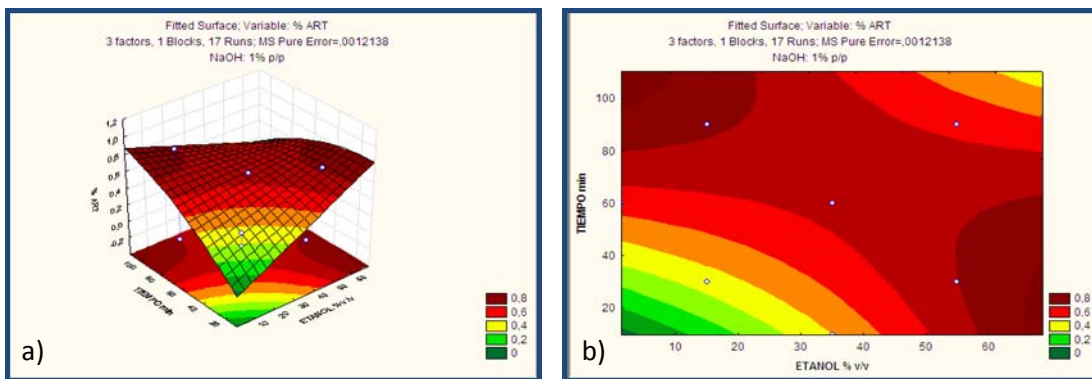


Figura 35: Etanol 68 % v/v, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.

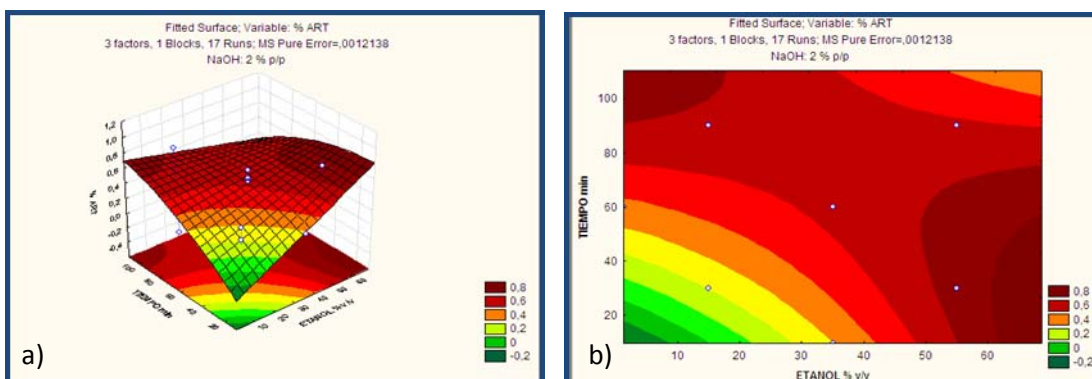
**GRÁFICAS DE SUPERFICIE Y DE CONTORNO ETANOL VS TIEMPO.**



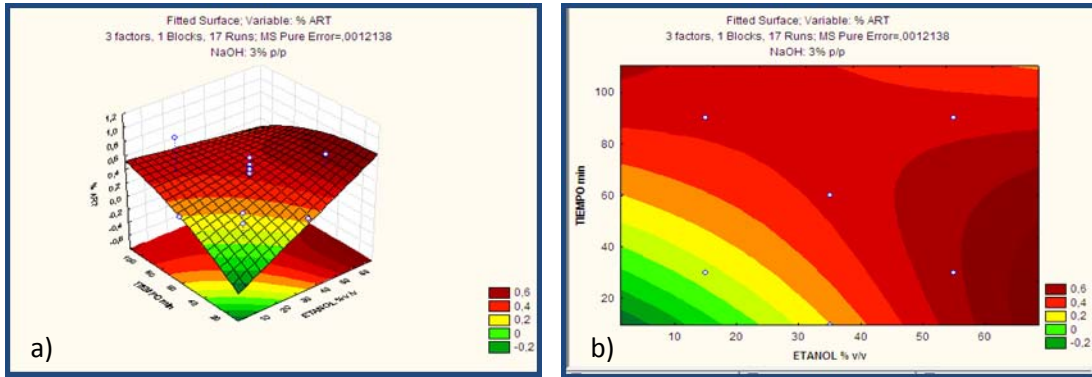
**Figura 36:** NaOH 0.318 % p/p, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.



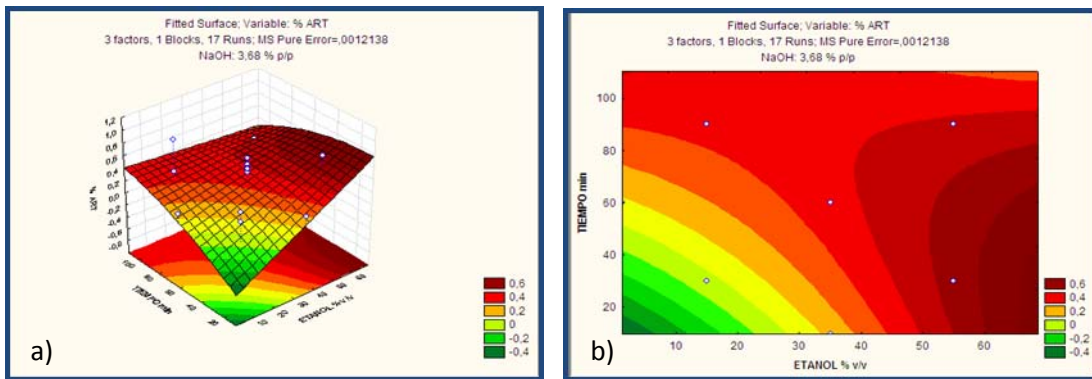
**Figura 37:** NaOH 1 % p/p, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.



**Figura 38:** NaOH 2 % p/p, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.



**Figura 39:** NaOH 3 % p/p, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.



**Figura 40:** NaOH 3.68 % p/p, a) Gráfica de superficie, b) Gráfica de contorno.

## ANEXO M: PRINCIPALES EQUIPOS USADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN



Figura 41: a) Autoclave Esterilizadora eléctrica, b) Balanza analítica.

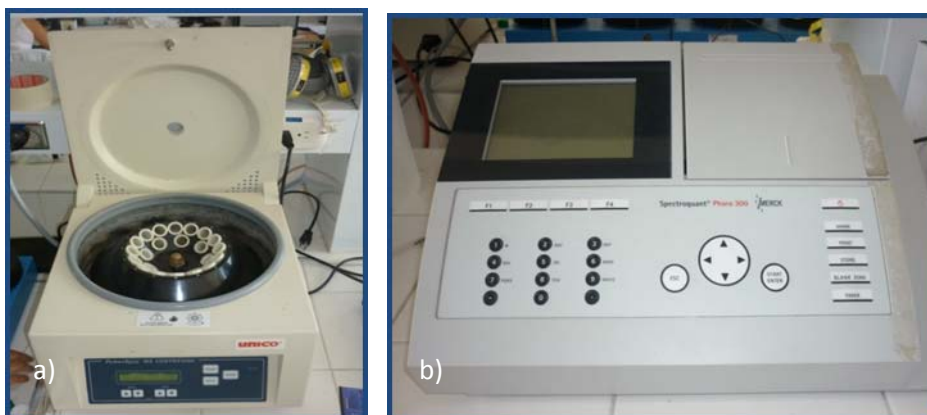
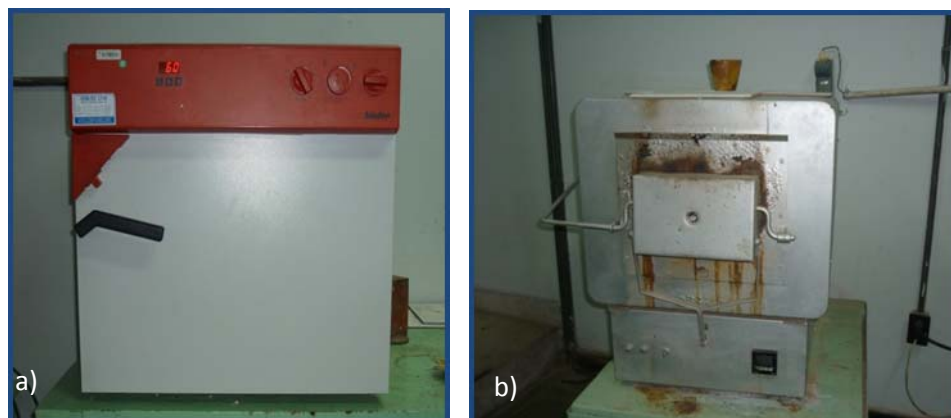
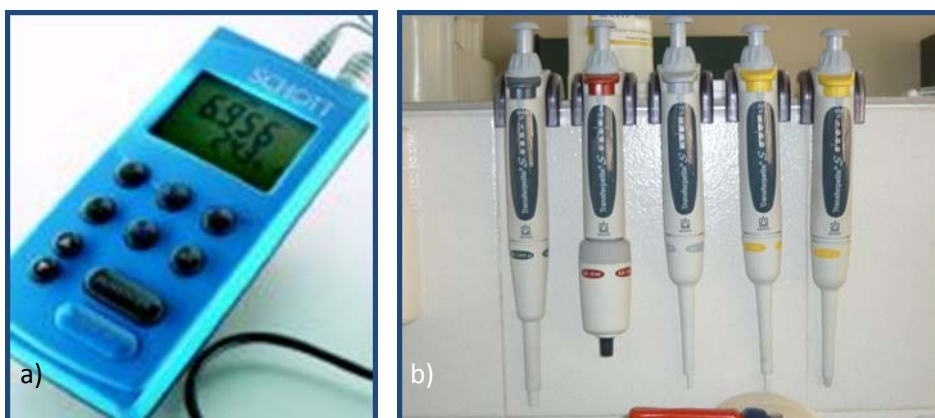


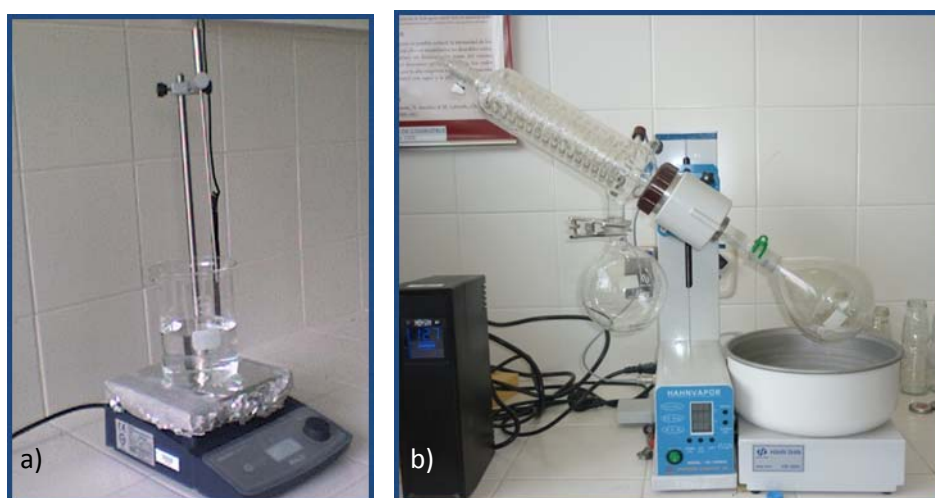
Figura 42: a) Centrifuga *PowerSpin*<sup>TM</sup>, b) Espectrofotómetro UV-VIS.



**Figura 43:** a) Estufa para secado, b) Mufla para laboratorios



**Figura 44:** a) Medidor de pH Handylab, b) Micropipetas



**Figura 45:** a) Plancha de calentamiento, b) Rotoevaporador