

**EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE RUTAS PARA LA OBTENCIÓN DE
MONOSACÁRIDOS Y LÍPIDOS A ESCALA LABORATORIO DE LA
MICROALGA *Navicula* sp.**

**LAURA ANTONIA PEÑARANDA RINCÓN
KAREN JOHANNA SEPÚLVEDA ORTIZ**

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

2011

**EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE RUTAS PARA LA OBTENCIÓN DE
MONOSACÁRIDOS Y LÍPIDOS A ESCALA LABORATORIO DE LA
MICROALGA *Navicula* sp.**

**LAURA ANTONIA PEÑARANDA RINCÓN
KAREN JOHANNA SEPÚLVEDA ORTIZ**

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

Director:

**Viatcheslav Kafarov
Ingeniero Químico Dr. Sc.**

Co-directores:

**Ángel Darío González Delgado
Ingeniero Químico**

**Alexander Guzmán Monsalve
Instituto Colombiano del Petróleo ICP
Químico Ph. D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2011**

*A mi madre Carmenza y a mi abuela Aminta
por el infinito amor, esfuerzo y apoyo incondicional
en todos los momentos de mi vida.*

Laura

A Dios por darme fortaleza en tiempos difíciles.

A mis padres por su gran esfuerzo y dedicación.

*A Eder, quien siempre creyó en mí, brindándome su amor y apoyo
incondicional.*

*Por último y no menos importante, a mis amigos que siempre llevaré en mi
corazón.*

Karen

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, por su financiación mediante el proyecto “Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel”.

Al Instituto Colombiano del Petróleo, por la colaboración en el marco de este proyecto.

Al Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por su respaldo como líder del proyecto.

Al Ing. Ángel Darío González, por sus valiosas enseñanzas, orientación y apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto.

Al grupo de investigación CIDES Y al Laboratorio de Biomasa, por permitir los medios necesarios para el desarrollo de esta investigación.

A Eduardo Carreño, Wilson Carreño y Guillermo Acero, por su apoyo y valiosa colaboración.

A la Universidad Industrial de Santander y en especial a la escuela de Ingeniería Química por las enseñanzas impartidas que nos formaron como profesionales.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. CONCEPTOS TEÓRICOS	18
1.1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS	18
1.1.1 Descripción de los géneros de microalgas utilizados	18
1.1.1.1 <i>Amphiprora</i> sp.	18
1.1.1.2 <i>Navicula</i> sp.	18
1.2 OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE MICROALGAS	18
1.2.1 Disrupción celular	19
1.2.1.1 Organosolv	19
1.2.1.2 Hidrólisis ácida	20
1.2.2 Métodos de extracción de lípidos	20
1.2.2.1 Extracción Soxhlet	20
2. DESARROLLO METODOLÓGICO	21
2.1 MATERIALES	21
2.1.1 Materia prima	21
2.1.2 Reactivos y equipos	21
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	22
2.2.1 Hidrólisis ácida - Extracción Soxhlet	22
2.2.2 Organosolv - Extracción Soxhlet	24
2.2.3 Sistema Polifuncional	25
2.2.3.1 Determinación de parámetros cinéticos	26
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	28

3.1 EVALUACIÓN DE LAS RUTAS HIDRÓLISIS ÁCIDA - EXTRACCIÓN SOXHLET Y ORGANOSOLV - EXTRACCIÓN SOXHLET	28
3.1.1 Influencia del tiempo de hidrólisis ácida en la eficiencia de extracción lipídica (ruta 1)	28
3.1.2 Efecto de la variación del tiempo de extracción Soxhlet en la eficiencia lipídica (rutas 1 y 2).....	29
3.2 EVALUACIÓN DE LA RUTA SISTEMA POLIFUNCIONAL	30
3.2.1 Efecto del solvente en la producción de azúcares reductores totales ..	30
3.2.1.1 Variación de las condiciones de operación del Sistema Polifuncional empleando etanol.....	31
3.2.1.2 Variación de las condiciones de operación del Sistema Polifuncional empleando metanol.....	34
3.2.2 Detección de lípidos y alquil-ésteres en la fase hexánica	36
3.3 COMPARACIÓN DE RUTAS PARA LA OBTENCIÓN DE LÍPIDOS Y MONOSACÁRIDOS	39
4. CONCLUSIONES	42
5. RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Metodología experimental para las rutas 1 y 2.	23
Figura 2. Metodología experimental para la ruta 3.....	26
Figura 3. Efecto del tiempo de hidrólisis ácida en la eficiencia de extracción lipídica.....	28
Figura 4. Influencia del tiempo de extracción Soxhlet en la eficiencia lipídica.	29
Figura 5. Modelo de la concentración de ART en el tiempo para el Sistema Polifuncional empleando etanol.	31
Figura 6. Concentración de ART en el tiempo a diferentes concentraciones de ácido para el Sistema Polifuncional empleando etanol.....	32
Figura 7. Concentración de ART en el tiempo a diferentes temperaturas para el Sistema Polifuncional empleando etanol.	33
Figura 8. Modelo de la concentración de ART en el tiempo para el Sistema Polifuncional empleando metanol.	34
Figura 9. Concentración de ART en el tiempo a diferentes temperaturas para el Sistema Polifuncional empleando metanol.	35
Figura 10. Concentración de ART en el tiempo a diferentes concentraciones de ácido para el Sistema Polifuncional empleando metanol.....	35
Figura 11. Espectros infrarrojos de la fase hexánica del Sistema Polifuncional. ..	37
Figura 12. Comparación de espectros infrarrojos de <i>Navicula</i> sp.....	38
Figura 13. Eficiencias de extracción lipídica en <i>Navicula</i> sp. de las rutas evaluadas.	40

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición Química de los géneros de microalgas empleados.	21
Tabla 2. Parámetros cinéticos del modelo de concentración de ART en el tiempo para el Sistema Polifuncional empleando etanol.	30
Tabla 3. Parámetros cinéticos del modelo de concentración de ART en el tiempo para el Sistema Polifuncional empleando metanol.	33
Tabla 4. Regiones características de espectros de lípidos y biodiesel.....	39
Tabla 5. Porcentajes de obtención de azúcares reductores totales (ART) en <i>Navicula</i> sp. de las rutas evaluadas.....	41

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A: Contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas de algunas especies de microalgas.....	50
ANEXO B: Imágenes de los géneros de microalgas empleados.....	52
ANEXO C: Medio de cultivo F/2	53
ANEXO D: Perfil de ácidos grasos de las microalgas empleadas	55
ANEXO E: Reactivos utilizados en la experimentación	57
ANEXO F: Equipos utilizados en la experimentación	58
ANEXO G: Método de cuantificación de azúcares reductores totales (ART)	61
ANEXO H: Protocolo del Sistema Polifuncional	63
ANEXO I: Códigos empleados en Matlab.....	65

RESUMEN

Título: EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE RUTAS PARA LA OBTENCIÓN DE MONOSACÁRIDOS Y LÍPIDOS A ESCALA LABORATORIO DE LA MICROALGA *Navicula* sp.*

Autores: Karen Johanna Sepúlveda Ortiz, Laura Antonia Peñaranda Rincón.**

Palabras Claves: Microalgas, lípidos, biodiesel, monosacáridos, cinética, extracción, disrupción.

La biomasa de microalgas es una alternativa promisorias para la producción de combustibles como el biodiesel y el bioetanol gracias a la cantidad de lípidos y polisacáridos presentes en su estructura celular. En este estudio se definieron y evaluaron diferentes rutas para la obtención de monosacáridos y lípidos de la microalga *Navicula* sp. implementando métodos de hidrólisis ácida, extracción Soxhlet, Organosolv, transesterificación *in situ* y DNS.

Se evaluó la ruta sistema polifuncional, variando el alcohol empleado, etanol y metanol, donde se obtuvieron azúcares, lípidos y además alquilésteres directamente de la biomasa, en una sola unidad de reacción y bajo las mismas condiciones de operación. Las rutas fueron comparadas en base a los porcentajes de lípidos y monosacáridos obtenidos. Para la ruta Hidrólisis ácida – Extracción Soxhlet se evaluaron diferentes tiempos de hidrólisis y extracción. Fue relevante con tiempos de dos y dieciséis horas respectivamente. Mediante la ruta Organosolv – Extracción Soxhlet se obtuvo una eficiencia lipídica de 47,96 % mientras que para el sistema polifuncional empleando metanol se obtuvo un porcentaje de ART de 1,75%. Además, se determinaron los parámetros cinéticos de la producción de ART a través del tiempo, para el sistema polifuncional empleando *Navicula* sp. Se estudiaron diferentes escenarios para este modelo, variando la temperatura y la concentración del ácido en intervalos desde 298 hasta 413 K y 10 a 30 mg/mL respectivamente. Mediante espectrofotometría de infrarrojo se comparó el pico de absorción del grupo carbonilo, característico del biodiesel, a través del tiempo. Las rutas Organosolv – Extracción Soxhlet y Sistema polifuncional presentaron mayor obtención de lípidos y monosacáridos, respectivamente.

Este trabajo está enmarcado en el proyecto “Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel” código 2008D32006-6710, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, el Instituto Colombiano del Petróleo ICP y la Corporación Instituto Morrosquillo.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Dr. Sc, Ph.D. Viatcheslav Kafarov, Codirectores: Ingeniero Químico Ángel Darío González Delgado, Ph.D. Alexander Guzmán Monsalve.

ABSTRACT

Title: EVALUATION AND COMPARISON OF ROUTES FOR OBTAINING LIPIDS AND MONOSACCHARIDES AT LABORATORY SCALE FROM MICROALGAE *Navicula* sp. *

Authors: Karen Johanna Sepúlveda Ortiz, Laura Antonia Peñaranda Rincón.**

Keywords: Microalgae, lipids, biodiesel, monosaccharides, kinetic, extraction, disruption.

Biomass from microalgae is a promising alternative for the production of fuels such as biodiesel and bioethanol due to the amount of lipids and polysaccharides in its cell structure. This study defined and assessed various routes for obtaining monosaccharides and lipids from the microalgae *Navicula* sp. implementing methods of acid hydrolysis, Soxhlet extraction, Organosolv pretreatment, *in situ* transesterification and DNS.

Multifunctional system route was evaluated, changing the alcohol used, ethanol and methanol, which were sugars, lipids and alkyl esters directly from the biomass into a single-step reaction unit and under the same operating conditions. The routes were compared based on the percentage of lipids and monosaccharides obtained. For the acid hydrolysis - Soxhlet extraction route were evaluated different times of hydrolysis and extraction. By Organosolv - Soxhlet extraction route, lipidic efficiency was 47.96% while for the multifunctional system using methanol, ART percentage was 1.75%. In addition, it was determined the kinetic parameters for ART production over time for the multifunctional system using *Navicula* sp. Different scenarios were studied for this model, varying the temperature and acid concentration ranges from 298 to 413 K and 10 to 30 mg/mL respectively. By Infrared spectrophotometry the absorption peak of carbonyl group, characteristic of biodiesel, was compared over time. Organosolv - Soxhlet extraction showed the highest lipid efficiency and multifunctional system showed more monosaccharides yield.

This work was framed in the "Bioprospecting Colombian microalgae for biodiesel production" project, code 2008D32006-6710, funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development, the Colombian Petroleum Institute ICP and the Corporation Morrosquillo Institute.

* Undergrade Project.

** Physicochemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Director: Dr. Sc, Ph.D. Viatcheslav Kafarov, Co-directors: Chemical Engineer Angel Darío González Delgado, Ph.D Alexander. Guzman Monsalve.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el uso continuo de combustibles derivados del petróleo se reconoce como insostenible debido al agotamiento de los suministros y la contribución de éstos a la contaminación del medio ambiente. Para la disminución de las emisiones de CO₂ causantes del calentamiento global es necesario sustituir los combustibles fósiles por una energía limpia y renovable [1]. La biomasa de microalgas se presenta como una alternativa promisoría para solucionar esta problemática gracias a su capacidad de asimilar el CO₂ como fuente de carbono para su crecimiento. Adicionalmente, esta misma biomasa tiene la capacidad de producir combustibles como el biodiesel y el bioetanol gracias a la cantidad de lípidos y polisacáridos presentes en su estructura celular [2].

Existe gran preocupación por la ineficiencia e inviabilidad de los combustibles producidos a partir de materias primas de primera y segunda generación. Frente a esto, la biomasa a partir de microalgas posee una elevada velocidad de crecimiento, lo que la convierte en una gran fuente de lípidos [3]. Además de su rápida reproducción, requieren solo de 0.1 m² de área de cultivo para producir 121104 kilogramos de biodiesel en un año, equivalente al 70% de su peso en biomasa seca [4], obteniendo un rendimiento para la elaboración del biodiesel, cerca de 25 veces mayor que el obtenido por un cultivo tradicional como el de palma de aceite.

La producción de biodiesel a partir de aceite de microalgas implica la extracción de los lípidos de la biomasa, seguido por su conversión a alquil ésteres y glicerol [5]. Los polisacáridos, compuestos principalmente de celulosa, pueden ser hidrolizados para obtener azúcares reductores a los que se les aplica el proceso de fermentación para producir bioetanol [6]. En el presente estudio se definen y evalúan las rutas de obtención de lípidos y monosacáridos de biomasa de la microalga *Navicula* sp., implementando métodos como disrupción celular ácida, extracción Soxhlet, Organosolv y transesterificación *in situ*.

1. CONCEPTOS TEÓRICOS

En este capítulo se presentan aspectos generales de las microalgas y de los géneros utilizados. Igualmente, se describen generalidades de los métodos empleados en la evaluación de las rutas planteadas.

1.1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que pueden crecer rápidamente y vivir en duras condiciones gracias a su estructura celular. Estos convierten la luz del sol, el agua, nutrientes inorgánicos y el dióxido de carbono en biomasa, produciendo eficientemente lípidos, carbohidratos, y proteínas en diferentes proporciones [7] (ANEXO A). Se estima que existen más de 50000 especies de microalgas pero solo cerca de 30000 han sido analizadas [2].

1.1.1 Descripción de los géneros de microalgas utilizados

1.1.1.1 *Amphiprora* sp. Es una diatomea (Bacillariophyceae), posee tallas cercanas a las 20 micras y forma rectangular 2:3. Se caracteriza por un rápido crecimiento y contenido de lípidos elevado. Su pared celular o frústula de color amarillo oro consta de dos mitades que se sobreponen y adaptan entre sí, constituyendo las valvas [8]. En el ANEXO B se muestran sus imágenes.

1.1.1.2 *Navicula* sp. Pertenece al grupo de las diatomeas; son microalgas unicelulares o coloniales, de plastos marrones o amarillos. Incluye individuos con valvas lanceoladas, estriadas transversalmente en la zona media, en sentido opuesto a los polos. Los extremos de la célula son redondeados [9].

1.2 OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE MICROALGAS

El uso de biomasa de microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles tales como biodiesel y bioetanol, ha sido satisfactorio debido a la

gran cantidad de carbohidratos y lípidos contenidos en su estructura celular. En la obtención de metabolitos de microalgas se identifican generalmente dos etapas importantes como son, disrupción celular y extracción lipídica.

1.2.1 Disrupción celular

Para permitir el paso de los metabolitos presentes en la biomasa de microalga a través de la pared celular es necesario incorporar una etapa de disrupción celular. Existen diferentes métodos de disrupción que pueden ser utilizados dependiendo de la pared celular de la microalga y del producto de obtención deseado [2]. Estos pueden incluir disminución en el tamaño de las partículas, exposición de la biomasa a altas temperaturas, uso de microbios y enzimas para degradar la biomasa con el fin de liberar los compuestos de interés [10] o el empleo de sustancias químicas, comúnmente ácidos o bases.

Las microalgas poseen características que las hacen excelentes candidatas para la obtención de azúcares [11, 12] debido a que tienen la capacidad de asimilar la celulosa que puede ser fermentada y posteriormente convertida en bioetanol [6]. Entre los pretratamientos químicos que se encargan de hidrolizar el material celulósico a azúcares fermentables y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa se encuentran, la Explosión con vapor, Ozonólisis, Hidrólisis y Organosolv. El pretratamiento ácido se destaca debido a que proporciona gran eficiencia en la transformación de material celulósico [13]. En cuanto a los parámetros que influyen en la efectividad de la hidrólisis se encuentran, el tiempo de proceso, temperatura, cantidad de sustrato y concentración del ácido [14].

1.2.1.1 Organosolv Es un proceso de hidrólisis de los materiales celulósicos presentes en la biomasa de la microalga que emplea solventes orgánicos como etanol, metanol y acetona [15]. Adicional al uso del solvente, el método Organosolv requiere el empleo de un catalizador que puede ser, una base, un ácido orgánico ó inorgánico para romper los enlaces de la celulosa.

1.2.1.2 Hidrólisis ácida Se emplean ácidos diluidos como H_2SO_4 y HCl a temperatura ambiente que hidrolizan el material celulósico en sus monómeros elementales, de esta forma se obtienen los azúcares que serán utilizados en posteriores procesos de fermentación [16].

1.2.2 Métodos de extracción de lípidos

El método escogido para la extracción depende de la naturaleza de la materia prima utilizada [17]. Existen diversos tipos de extracción tales como, extracción con solventes químicos, fluidos supercríticos, autoclave, ultrasonido, destrucción mecánica, entre otras [18]. Un proceso ideal de extracción lipídica para la producción de biodiesel a partir de microalgas debe ser específico en cuanto a los lípidos extraídos con el fin de minimizar la co-extracción de otro tipo de sustancias contaminantes, y además ser selectivo hacia las fracciones lipídicas de interés.

1.2.2.1 Extracción Soxhlet La extracción Soxhlet es aplicada en muestras sólidas y se conoce generalmente como extracción sólido-líquido o lixiviación [19]. Se calienta el disolvente situado en un matraz, se condensan sus vapores que caen gota a gota sobre un cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel de disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, asciende por un sifón y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa el tiempo de extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el disolvente [20]. Terminada la extracción, se recupera el solvente mediante destilación simple, rotoevaporación o volatilización con el fin de concentrar el extracto en el matraz. Dado que el punto de ebullición del extracto obtenido siempre será superior al del solvente, el solvente destilado no contiene cantidades importantes de éste [21].

2. DESARROLLO METODOLÓGICO

En esta sección se presenta la metodología empleada para definir, evaluar y comparar las rutas de obtención de lípidos y monosacáridos a partir de biomasa de microalgas. Se describen los equipos, materiales, software y métodos utilizados en cada una de las etapas necesarias para la extracción de estos productos.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materia prima

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó biomasa de las microalgas *Navicula* sp. y *Amphiprora* sp. proporcionadas por la Corporación Instituto de Morrosquillo (Punta Bolívar, Colombia), las cuales fueron cultivadas en medio F/2 (ANEXO C), cosechadas por floculación y filtración, y posteriormente secadas mediante exposición solar. La caracterización de la biomasa fue realizada por el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), los datos se presentan en la tabla 1. Cabe resaltar que el alto porcentaje de cenizas se debe al floculante empleado, el cual afecta negativamente el porcentaje propio de los metabolitos de las microalgas. En el ANEXO D se reporta el perfil de ácidos grasos para estos dos géneros.

Tabla 1. Composición Química de los géneros de microalgas empleados.

Género	Composición Química [%]					
	Humedad	Nitrógeno	Proteína	Cenizas	Carbohidratos	Lípidos
<i>Navicula</i> sp.	0	3,2	15,1	51,6	5,2	13,2
<i>Amphiprora</i> sp.	0	2,1	10,0	52,8	6,2	12,0

Fuente: Informe Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL.

2.1.2 Reactivos y equipos

En la etapa de disrupción celular se implementaron los siguientes reactivos: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y metanol. Para la extracción Soxhlet, se utilizó como solvente, hexano. En la ruta Sistema Polifuncional, metanol, etanol y ácido

sulfúrico. Para determinar la concentración de ART se utilizó ácido 3,5-dinitrosalicílico (ANEXO E). Durante todo el desarrollo experimental se empleó agua destilada. En el ANEXO F, se presentan los equipos utilizados y sus respectivas especificaciones.

2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Considerando los métodos evaluados en trabajos anteriores [22,23,24], tanto para la obtención de lípidos como para la producción de monosacáridos, las rutas planteadas fueron las siguientes:

1. Hidrólisis ácida - Extracción Soxhlet
2. Organosolv - Extracción Soxhlet
3. Sistema Polifuncional

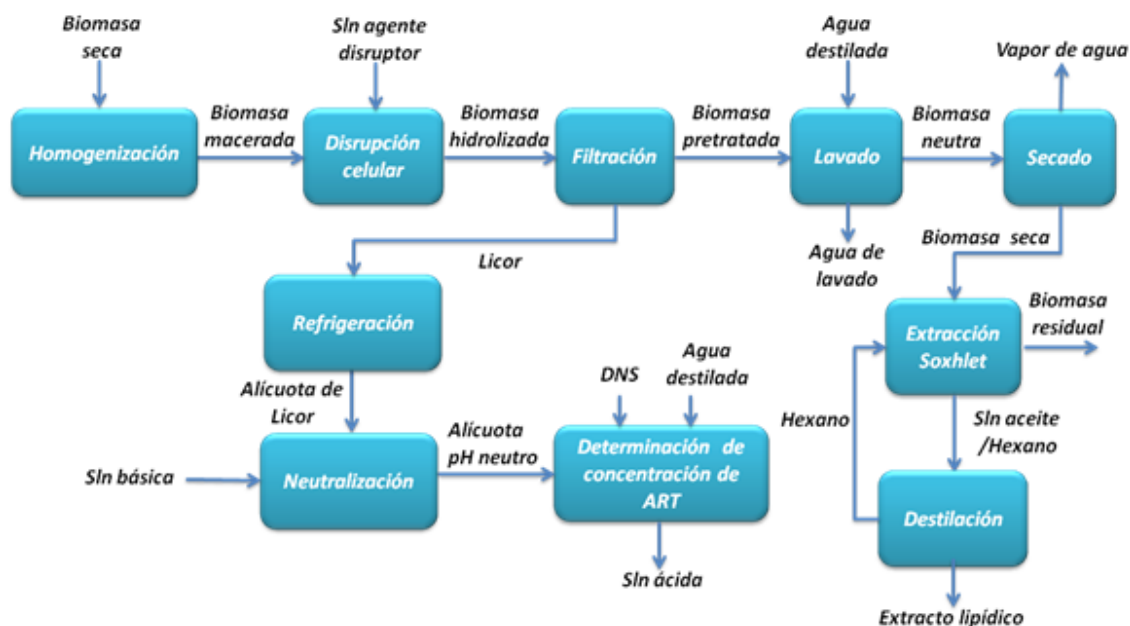
Para las rutas 1 y 2, se siguió la metodología experimental de la figura 1. El procedimiento utilizado en la ruta 3 se presenta en la figura 2. A continuación, se describen las condiciones de operación empleadas en cada ruta.

2.2.1 Hidrólisis ácida - Extracción Soxhlet

Para la evaluación de esta ruta fue necesario establecer el mejor tiempo tanto para la hidrólisis ácida, como para la extracción Soxhlet en la obtención de lípidos. En ese orden de ideas, utilizando inicialmente la microalga *Amphiprora* sp., se varió la duración del pretratamiento y se mantuvo constante el tiempo de extracción Soxhlet. Se realizaron entonces hidrólisis de 30, 60 y 120 minutos.

Una solución compuesta por 10 g de biomasa homogenizada y ácido clorhídrico 0,5 M, se sometió a agitación a una velocidad de 500 rpm a temperatura ambiente. La biomasa pretratada se filtró al vacío donde se separó del licor, el cual contiene fracciones de biomasa hidrosoluble [22]. Dicho licor se neutralizó y refrigeró con el fin de detener la reacción y así evitar la degradación de los monosacáridos o azúcares reductores [25]. La concentración de azúcares reductores totales (ART),

Figura 1. Metodología experimental para las rutas 1 y 2.



Fuente: Los autores.

fue determinada según el método de cuantificación DNS, descrito por Miller [26] (Anexo G). Por otra parte, la biomasa pretratada se lavó hasta alcanzar un pH cercano a 7 y se secó a 105 °C durante 4 horas.

Los lípidos presentes en la biomasa hidrolizada fueron extraídos con el solvente orgánico, hexano, en un equipo Soxhlet siguiendo la metodología desarrollada por Córdoba *et al.* [27]. Al finalizar la extracción se retiró la biomasa residual, mientras que la mezcla solvente - extracto fue sometida a destilación con el fin de recuperar y reutilizar el solvente. La cuantificación de los lípidos obtenidos se realizó mediante gravimetría. Con el fin de volatilizar el hexano remanente, el extracto lipídico fue dejado en una cámara extractora. Se realizaron mediciones del peso periódicamente, hasta obtener un valor constante.

Una vez realizado el procedimiento anterior para cada tiempo de hidrólisis planteado (30, 60 y 120 min.) y manteniendo la misma duración de extracción Soxhlet, se calculó la eficiencia lipídica (Ecuación 2.2) con el porcentaje total de

lípidos en *Amphiprora* sp. reportado en la tabla 1. Según estos resultados, se estableció el mejor tiempo de hidrólisis ácida.

$$\% \text{ de Extracción} = \frac{\text{Peso de aceite}}{\text{Peso de biomasa}} \times 100 \quad (2.1)$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{\% \text{ Extracción experimental de lípidos}}{\% \text{ De lípidos reportado en caracterización}} \times 100 \quad (2.2)$$

Para evaluar el efecto del tiempo de la extracción Soxhlet en la obtención de lípidos, con el tiempo definido para la hidrólisis ácida, se llevaron a cabo nuevamente tres experimentos, variando los tiempos de extracción, 8, 12 y 16 horas. De acuerdo a las eficiencias lipídicas se determinó el mejor tiempo de extracción.

Para la determinación de los mejores tiempos de hidrólisis ácida y de extracción Soxhlet se utilizó el género *Amphiprora* sp. Con el fin de comparar las rutas planteadas con un mismo género de microalga y para realizar la respectiva evaluación de esta ruta, se empleó biomasa del género *Navicula* sp. Se siguió nuevamente la metodología descrita, aplicando las condiciones halladas inicialmente con *Amphiprora* sp. Esto, considerando que los dos géneros pertenecen a la misma clase de microalga, Bacillariophyceae o diatomea [28, 29], también por poseer características similares, ya que ambas pertenecen al orden Naviculales, una pared celular delgada y vacuolas ricas en lípidos [8]; además de tener una composición química casi idéntica como se muestra en la tabla 1. Al igual que en las anteriores pruebas, para evaluar esta ruta, se cuantificó la concentración de ART presente en el licor y con el porcentaje de lípidos en *Navicula* sp. se calculó el porcentaje de eficiencia lipídica.

2.2.2 Organosolv - Extracción Soxhlet

Esta ruta consiste en una disrupción celular a alta temperatura y a presión controlada, la cual es promovida por un arrastre de vapor y un solvente orgánico,

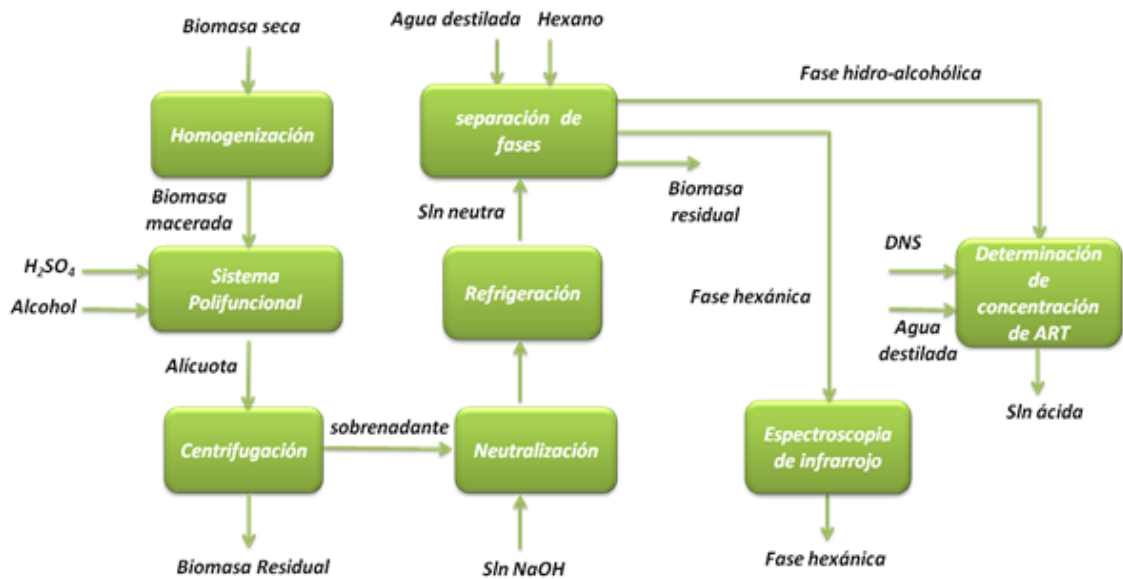
seguida de una extracción Soxhlet con hexano. Para la disrupción celular se utilizaron las condiciones de operación determinadas por Meza & Sepúlveda [24]; para la extracción Soxhlet, el mejor tiempo hallado en la ruta 1. Con biomasa de *Navicula* sp. y siguiendo la metodología anterior (Figura 1), al licor obtenido después de la filtración, se le determinó concentración de ART. La cuantificación de los lípidos obtenidos se realizó mediante gravimetría por volatilización y se calculó la eficiencia lipídica de la prueba.

2.2.3 Sistema Polifuncional

Con el fin de proponer un proceso integrado en el que se obtengan azúcares y lípidos en una misma unidad de reacción, bajo las mismas condiciones de operación, y como beneficio adicional, la posibilidad de una obtención directa de biodiesel, se planteó, evaluó y comparó la ruta denominada Sistema Polifuncional, cuyas condiciones de operación se definieron con base en los estudios de transesterificación *in situ* planteados por Ehimen *et al.* [5], procesos multifuncionales para el aprovechamiento de biomasa de microalgas propuestos por Gonzalez & kafarov [30] y transesterificación de aceite de microalgas propuesto por Plata, *et al.* [31]. Para hacer una posterior comparación en esta ruta se propuso evaluar el comportamiento del sistema con etanol y metanol (Figura 2).

Se determinó una proporción de 1:6, biomasa-alcohol. Lo anterior se realizó con el propósito de impulsar la reacción en dirección de los ésteres etílicos o metílicos según el alcohol empleado (Modificado de Ehimen *et al.* [5] y Johnson & Wen, [32]). Se utilizó ácido sulfúrico como catalizador ácido de la transesterificación en relación másica de aceite-ácido 1:1, con base en el contenido de aceite de la microalga *Navicula* sp. (Tabla 1) (Modificado de Johnson & Wen, [32] y Plata, *et al.* [31]). La solución se sometió a agitación (500 rpm) hasta un tiempo máximo de 28 horas y a una temperatura de 60 °C, tomándose una alícuota a intervalos de tiempo variables. Cada muestra se centrifugó y neutralizó. Adicionalmente, se implementó una separación de lípidos neutros agregando hexano a la solución

Figura 2. Metodología experimental para la ruta 3.



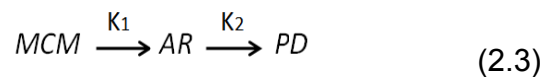
Fuente: Los autores.

sobrenadante, con el fin de separar los componentes lipídicos y otros productos de reacción solubles en hexano de la biomasa residual y de la fase hidró-alcohólica donde quedan contenidos los ART y demás componentes polares. Las muestras de fase hexánica se sometieron a pruebas de infrarrojo por transformada de Fourier para determinar los lípidos transesterificados. Por otra parte a las muestras restantes con fase hidró-alcohólica se les realizó cuantificación de ART (ANEXO H). Con el fin de realizar una comparación de rutas enfocada al rendimiento de obtención de aceite, se realizó una extracción de lípidos a la biomasa residual.

2.2.3.1 Determinación de parámetros cinéticos

En la ruta 3 se modeló para cada uno de los sistemas planteados (etanol y metanol) con base en la información experimental obtenida, la producción de azúcares reductores en el tiempo, variando la concentración del ácido y la temperatura. La cinética empleada fue la siguiente:

El modelo de reacción del material celulósico de microalgas (MCM) se muestra en la ecuación 2.3. Donde se presenta una reacción consecutiva de primer orden con dos pasos irreversibles, en la cual AR , se refiere a azúcares reductores y PD , productos de degradación. Este modelo ha sido exitosamente aplicado para hidrólisis de una gran variedad de residuos lignocelulósicos [30, 33, 34].



Las ecuaciones cinéticas que describen la variación en el tiempo del material celulósico de microalgas y de los productos son:

$$\frac{dC_C}{dt} = -K_1 [C_C] \quad (2.4)$$

$$\frac{dC_{AR}}{dt} = K_1 [C_C] - K_2 [C_{AR}] \quad (2.5)$$

La ecuación 2.4 expresa la velocidad de monomerización del material celulósico, la ecuación 2.5 describe el cambio de la concentración de azúcares reductores en el tiempo, donde C_C es la concentración de material celulósico de microalgas y C_{AR} es la concentración de azúcares reductores. Mediante el software Matlab[®] y la herramienta Solver de Microsoft Excel[®] se calcularon los parámetros cinéticos relacionados con el proceso multifuncional. Para la determinación de estos, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$C_{AR} = C_{C0} \frac{K_1}{K_2 - K_1} * (e^{-K_1 t} - e^{-K_2 t}) \quad (2.6)$$

$$K_i = C_{acid}^n A_i e^{-E_i/RT} \quad (2.7)$$

La ecuación 2.6 se obtuvo mediante desarrollo matemático, ésta relaciona la concentración de azúcares reductores con las constantes de velocidad y el tiempo. C_{C0} , se determinó con base en el porcentaje de material celulósico en microalgas reportado por Ververis *et al.* [35]. La ecuación tipo Arrhenius (Ecuación 2.7) presenta la constante de velocidad K_i en función de la temperatura. C_{acid} es la concentración de ácido empleada experimentalmente.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

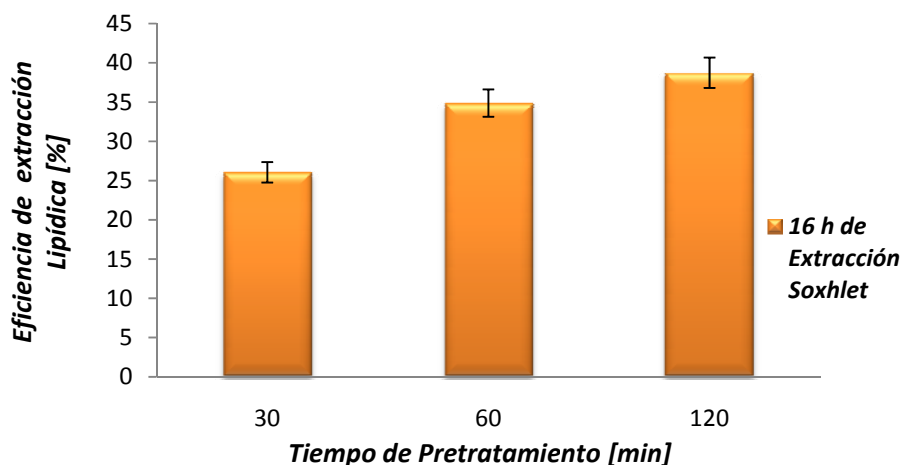
A continuación se presentan y analizan los resultados obtenidos en las pruebas experimentales y de simulación llevadas a cabo en el desarrollo de este trabajo. En el análisis se discuten aspectos como la eficiencia de la extracción lipídica según el tipo de pretratamiento, la influencia del tipo de alcohol empleado, el efecto de la variación de la temperatura y de la concentración de ácido en la obtención de azúcares reductores, entre otros.

3.1 EVALUACIÓN DE LAS RUTAS HIDRÓLISIS ÁCIDA - EXTRACCIÓN SOXHLET Y ORGANOSOLV - EXTRACCIÓN SOXHLET

3.1.1 Influencia del tiempo de hidrólisis ácida en la eficiencia de extracción lipídica (ruta 1)

En la figura 3 se muestra la eficiencia lipídica obtenida para diferentes tiempos de disrupción celular ácida en *Amphiprora* sp. La biomasa tratada durante 30, 60 y 120 minutos se sometió a extracción Soxhlet de 16 horas. Por medio del pretrata-

Figura 3. Efecto del tiempo de hidrólisis ácida en la eficiencia de extracción lipídica.



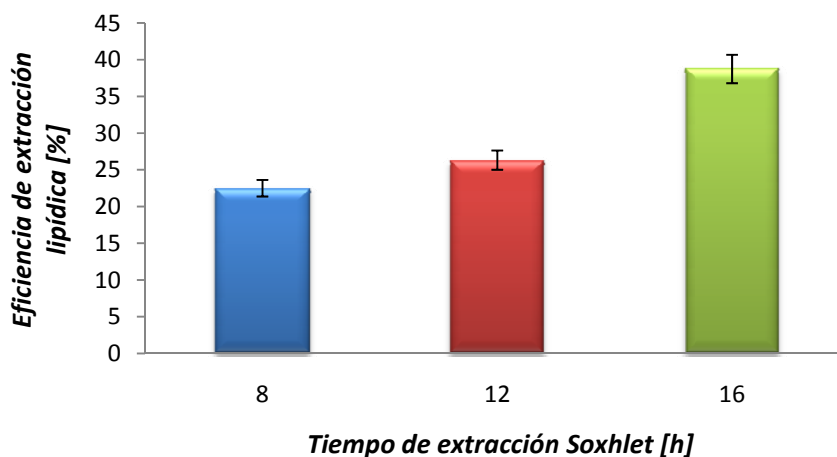
Fuente: Los autores.

miento de hidrólisis ácida durante 120 minutos incrementó la eficiencia de extracción lipídica, obteniendo un mayor resultado, 38,74 %, en comparación con los realizados para 30 y 60 minutos de pretratamiento. Esta diferencia se puede presentar por el grado de lisis celular, es decir, ruptura a nivel de la pared celular de la microalga en relación al tiempo de contacto con el agente disruptor, permitiendo que los lípidos estén expuestos en mayor o menor medida al solvente de extracción, lo cual incide en la eficiencia lipídica obtenida [22]. Se estableció entonces, como mejor tiempo de disrupción celular ácida, 120 minutos, el cual se implementó en los posteriores experimentos.

3.1.2 Efecto de la variación del tiempo de extracción Soxhlet en la eficiencia lipídica (rutas 1 y 2)

Durante dieciséis horas de extracción se obtuvo una eficiencia de 38,74 %, considerablemente mayor respecto a 22,5 % para ocho horas y 26,33% para doce horas de extracción (Figura 4).

Figura 4. Influencia del tiempo de extracción Soxhlet en la eficiencia lipídica.



Fuente: Los autores.

Se definió la ruta Hidrólisis ácida – Extracción Soxhlet, con tiempos de reacción de dos y dieciséis horas, respectivamente. Donde se obtuvo una eficiencia de

extracción lipídica de 38,74 % para *Amphiprora* sp. y 39,98 % para *Navicula* sp. Estos valores cercanos demuestran el comportamiento similar de las microalgas Naviculales a las condiciones encontradas.

De la misma forma, se fijó dieciséis horas de extracción para la ruta Organosolv – Extracción Soxhlet, obteniéndose una eficiencia lipídica de 47,96 % para *Navicula* sp., valor superior al obtenido mediante la ruta 1, lo cual indica un mejor desempeño del pretratamiento Organosolv frente a la hidrólisis ácida.

3.2 EVALUACIÓN DE LA RUTA SISTEMA POLIFUNCIONAL

3.2.1 Efecto del solvente en la producción de azúcares reductores totales

En la ruta Sistema Polifuncional para los sistemas de etanol y metanol, se simuló el comportamiento de la concentración de azúcares reductores totales a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido sulfúrico. Para la estimación de los parámetros cinéticos, mediante el software MatLab®, con los resultados experimentales de concentración de ART en el tiempo y la ecuación 2.6 se encontraron para cada sistema (etanol y metanol), las constantes de velocidad de reacción, K_1 y K_2 (códigos ANEXO I); con la herramienta Solver de Excel® se obtuvieron los demás parámetros (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Parámetros cinéticos del modelo de concentración de ART en el tiempo para el Sistema Polifuncional empleando etanol.

Ácido Sulfúrico T= 60 °C						
	<i>n</i>	<i>A</i> [min⁻¹]	<i>E</i> [kJ/mol]	<i>K</i>[min⁻¹]	<i>X</i>_{E/M}	<i>Y</i>_{E/M}
<i>Azúcares reductores</i>	0,1574	0,0500	15,5199	0,0003	1,01	0,99
<i>Productos de degradación</i>	0,3515	1,1255	14,0819	0,0200		

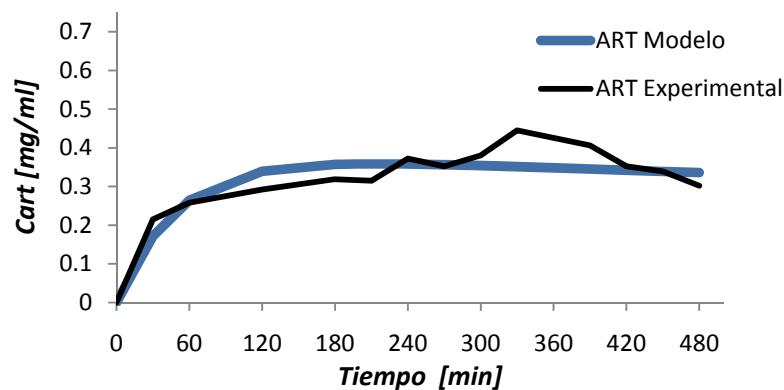
Fuente: Los autores.

En la anterior tabla, n es un factor exponencial que potencia la concentración del ácido, A es un factor pre-exponencial o constante de Arrhenius, E es la energía de

activación, K constante de velocidad de la reacción, X_{EM} es la relación entre la concentración experimental de ART respecto a la concentración modelada de ART en el tiempo, Y_{EM} es la relación del logaritmo de la concentración experimental de ART respecto al logaritmo de la concentración modelada de ART en el tiempo.

Según el modelo encontrado para el sistema empleando etanol (Figura 5), la mayor cantidad de ART, se obtiene alrededor de 200 minutos, estabilizándose hasta los 300 minutos. Posteriormente, se presenta una degradación de los azúcares reductores totales. Este comportamiento se observa debido a la ruptura celular llevada a cabo por el ácido sulfúrico y la degradación de los ART por el tiempo de contacto con el mismo. Cabe señalar la doble función del ácido en este sistema, hidroliza el material celulósico formando monómeros y deja libres los lípidos presentes en la microalga [30].

Figura 5. Modelo de la concentración de ART en el tiempo para el Sistema Polifuncional empleando etanol.



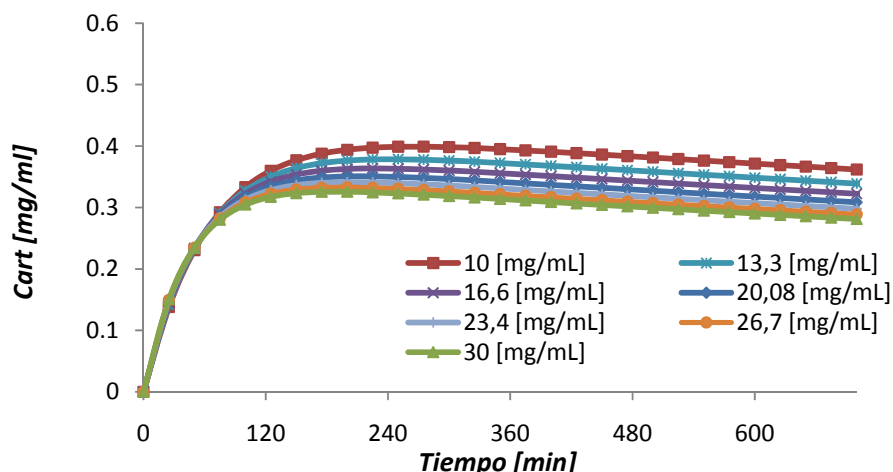
Fuente: Los autores.

3.2.1.1 Variación de las condiciones de operación del Sistema Polifuncional empleando etanol

Como se puede observar en la figura 6, de acuerdo al modelo hallado, la producción de ART aumenta de manera constante y en igual valor para diferentes

concentraciones de ácido hasta aproximadamente 75 minutos de reacción, es decir, se da el mismo grado de monomerización. A partir de este tiempo, para una concentración de ácido de 10 mg/mL se obtiene mayor concentración de azúcares reductores a través del tiempo. Para una concentración de ácido sulfúrico de 30 mg/mL, la concentración de ART es ligeramente menor. Concentraciones bajas de ácido permiten menor degradación de azúcares reductores, por tanto se obtiene mayor concentración de los mismos a lo largo del tiempo.

Figura 6. Concentración de ART en el tiempo a diferentes concentraciones de ácido para el Sistema Polifuncional empleando etanol.

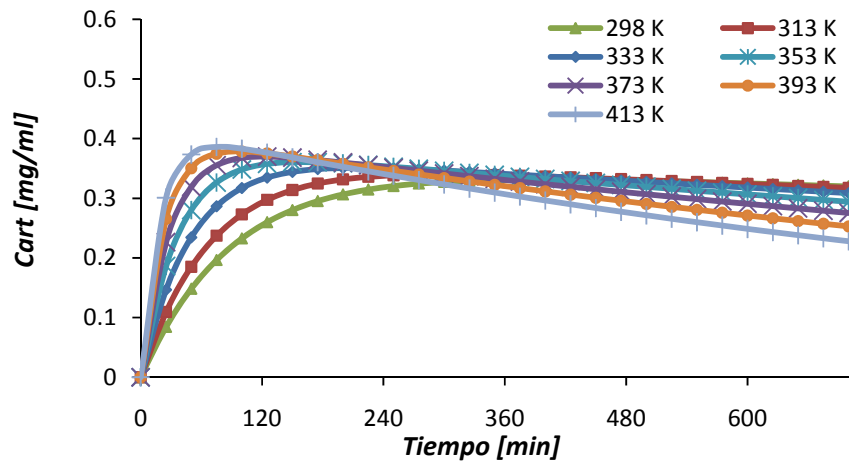


Fuente: Los autores.

En la figura 7 se muestra el efecto de la variación de la temperatura sobre la concentración de ART en el tiempo, empleando etanol. Se mantuvo la concentración de ácido sulfúrico de la etapa experimental, 20 mg/mL.

En este sistema, la producción de ART aumenta más rápidamente para una temperatura de 413 K hasta un tiempo de 75 minutos, obteniendo una concentración máxima de 0,38 mg/mL. Así mismo, la degradación de azúcares reductores ocurre más rápido después del tiempo mencionado. Al disminuir la temperatura a 298 K, se da un menor incremento en la concentración de ART a

Figura 7. Concentración de ART en el tiempo a diferentes temperaturas para el Sistema Polifuncional empleando etanol.



Fuente: Los autores.

través del tiempo, no obstante, la degradación es más lenta en comparación con temperaturas superiores.

Los parámetros cinéticos del modelo de concentración de ART en el tiempo encontrados para el sistema empleando metanol, se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos del modelo de concentración de ART en el tiempo para el Sistema Polifuncional empleando metanol.

Ácido Sulfúrico $T= 60\text{ }^{\circ}\text{C}$						
	n	$A\text{ [min}^{-1}\text{]}$	$E\text{ [kJ/mol]}$	$K\text{ [min}^{-1}\text{]}$	$X_{E/M}$	$Y_{E/M}$
Azúcares reductores	0,1606	0,0267	15,5203	0,0002	1,02	0,90
Productos de degradación	0,3435	0,4494	14,3806	0,0070		

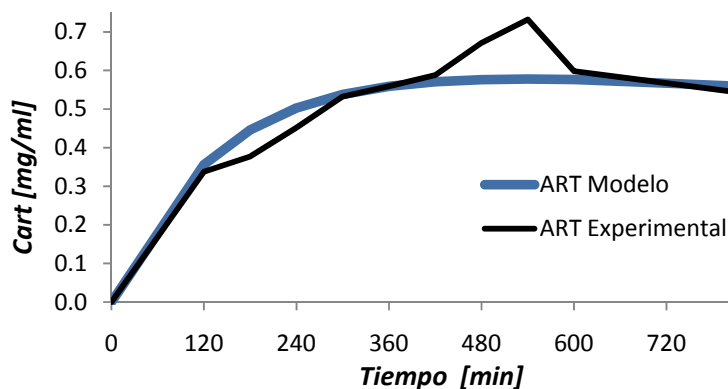
Fuente: Los autores.

El factor exponencial de la concentración del ácido (n), para las reacciones de producción de azúcares reductores y degradación de productos entre los sistemas de etanol y metanol, tienen valores muy similares. La energía de activación (E) igualmente muestra un cambio poco relevante entre ambos sistemas. Sin embargo, para la reacción de degradación de productos en el sistema empleando

etanol, la constante de Arrhenius (A) presenta un incremento importante respecto al mismo valor para el sistema con metanol. De acuerdo a la ecuación 2.7, este incremento en el valor del factor A, causa el aumento significativo de la constante de degradación de azúcares (k) para el sistema empleando etanol.

Con los parámetros de la tabla 3, se realizó el modelo cinético (Figura 8) para el sistema empleando metanol. La mayor concentración de ART se presenta en 540 minutos, manteniéndose estable hasta 600 minutos. Después de este tiempo se empieza a presentar una ligera degradación del ART. Al comparar los modelos cinéticos se encontró que la concentración máxima esperada utilizando etanol es 0,35 mg/mL en 200 minutos, mientras que con metanol, para este tiempo ya existe una producción de 0,48 mg/mL, siendo la concentración máxima de este sistema 0,58 mg/mL.

Figura 8. Modelo de la concentración de ART en el tiempo para el Sistema Polifuncional empleando metanol.

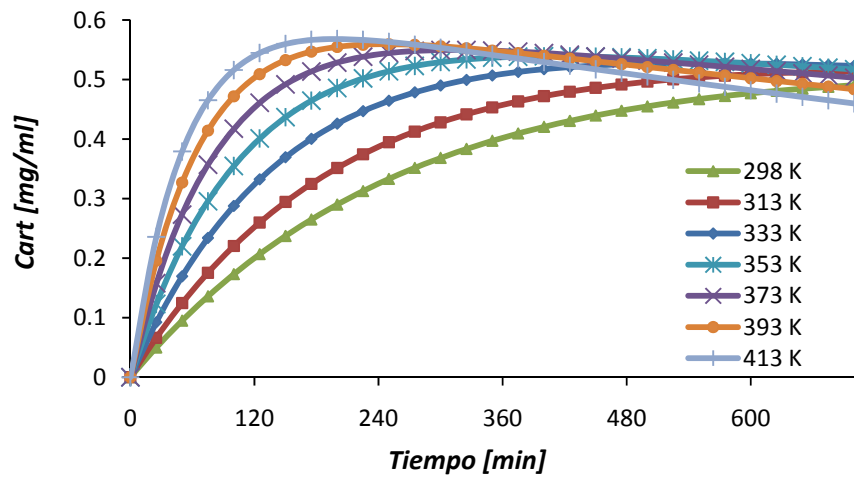


Fuente: Los autores.

3.2.1.2 Variación de las condiciones de operación del Sistema Polifuncional empleando metanol

Para el sistema con metanol, se encontró también que al aumentar la temperatura, aumenta la rapidez de producción de ART, pero a su vez se da más rápido la degradación de los azúcares reductores (Figura 9).

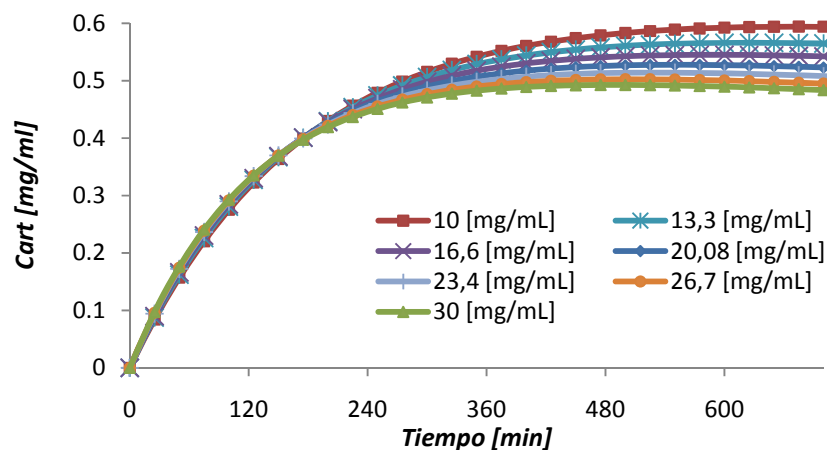
Figura 9. Concentración de ART en el tiempo a diferentes temperaturas para el Sistema Polifuncional empleando metanol.



Fuente: Los autores.

En la figura 10 se presenta el efecto de la variación de la concentración del ácido para el sistema empleando metanol. Hasta 175 minutos, el cambio de la concentración de ART en el tiempo tiene el mismo valor para diferentes concentraciones de ácido. A partir de este tiempo se obtiene la mayor concentración de azúcares para una concentración de ácido de 10 mg/mL.

Figura 10. Concentración de ART en el tiempo a diferentes concentraciones de ácido para el Sistema Polifuncional empleando metanol.



Fuente: Los autores.

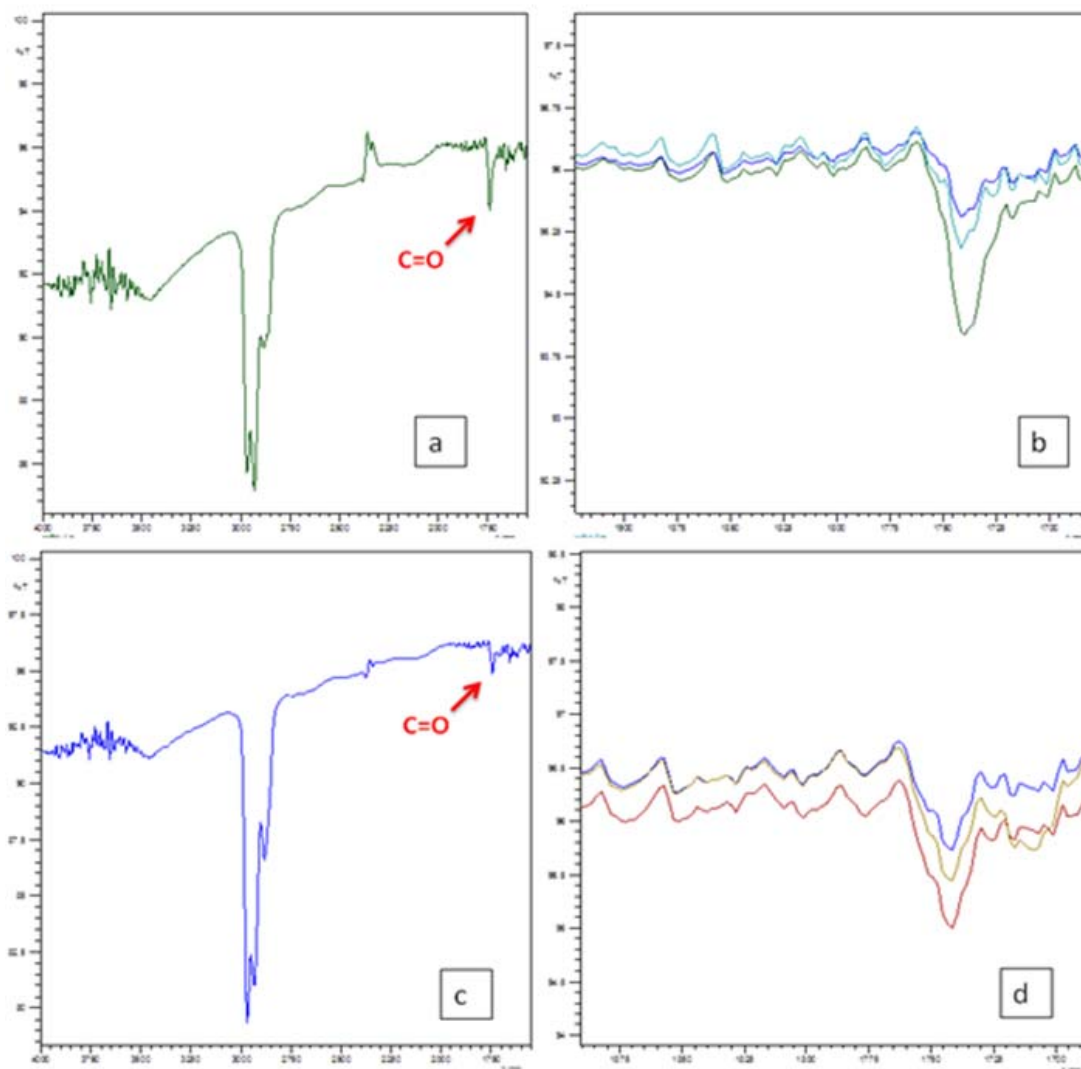
Al igual que para el sistema con etanol, la concentración de ART es levemente menor para una concentración de ácido sulfúrico de 30 mg/mL, significando esto, que la variación de la temperatura ejerce un cambio más significativo en la concentración de ART a través del tiempo respecto al que ejerce la variación en la concentración del ácido.

Los modelos simulados para el sistema con metanol y el sistema con etanol, respecto a la variación de la temperatura, presentan un comportamiento similar (Figuras 7 y 9). Sin embargo, se puede observar la diferencia notable de las concentraciones de ART para un mismo tiempo. Según esto, el tipo de alcohol empleado es un factor influyente en la concentración máxima esperada de ART. Se puede establecer entonces, que empleando metanol para la ruta Sistema Polifuncional se obtendrá una mayor concentración de ART en el tiempo.

3.2.2 Detección de lípidos y alquil-ésteres en la fase hexánica

Se realizaron mediciones de transmitancia en el infrarrojo medio para las muestras obtenidas de la fase hexánica de los dos sistemas planteados para la ruta Sistema Polifuncional. Los espectros obtenidos mediante espectroscopía infrarroja (FTIR), indicaron la presencia de una banda entre los 2800 y 3000 cm^{-1} , correspondiente a las cadenas alifáticas y un aumento del área de la banda correspondiente al enlace carbonilo (C=O) sobre 1750 cm^{-1} , desde 2 horas de reacción para el sistema empleando etanol y desde una hora de reacción para el sistema empleando metanol (Figura 11). Estas son bandas asociadas a los ésteres, los cuales provienen de material intracelular liberado y/o la formación de ésteres de ácidos grasos. Demostrando entonces, que durante el proceso polifuncional, tanto con metanol como con etanol, ocurre ruptura celular en la cual se liberan los lípidos a través del tiempo.

Figura 11. Espectros infrarrojos de la fase hexánica del Sistema Polifuncional.

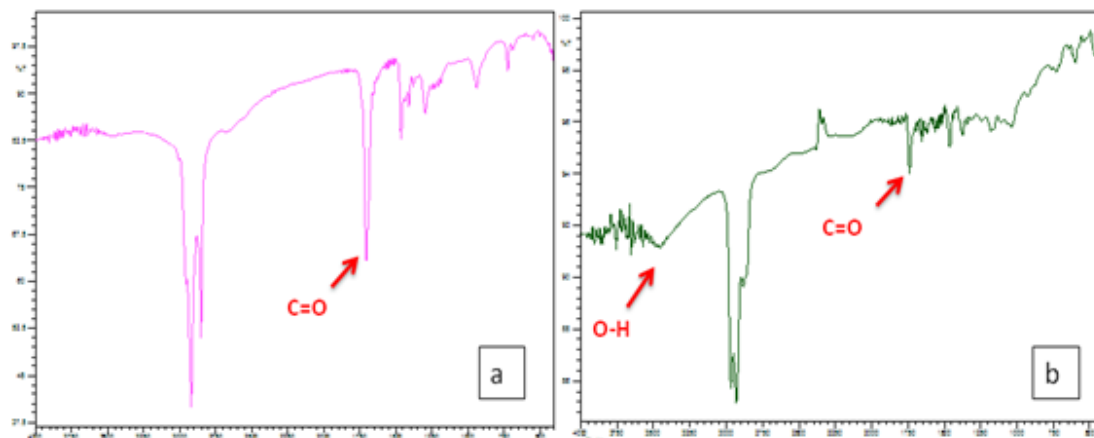


- a) Muestra de cuatro horas empleando etanol. b) Comparación de espectros para muestras de dos, tres y cuatro horas del sistema con etanol. c) Muestra de una hora empleando metanol. d) Comparación de espectros para muestras de una, dos y cinco horas del sistema con metanol.

Fuente: Los autores.

Se realizó además espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para muestras obtenidas mediante la ruta 1 (Figura 12). Cabe resaltar que los espectros FTIR de aceite y biodiesel son muy similares, sin embargo existen diferencias detectables [36].

Figura 12. Comparación de espectros infrarrojos de *Navicula* sp.



a) Espectro de muestra lipídica de la ruta Hidrólisis ácida- Extracción Soxhlet. b) Espectro de muestra de 4 horas del Sistema Polifuncional empleando etanol.

Fuente: Los autores.

El enlace éster aparece tanto en lípidos como en biodiesel [36, 37, 38], pero la posición de esta banda es sensible a los efectos de sustitución y a la estructura de la molécula [39]. Este enlace carbonilo (C=O) para lípidos se encontró a 1704 cm^{-1} y para ésteres etílicos y metílicos a 1750 cm^{-1} . En los espectros IR de las muestras de extracto lipídico y la fase hexánica de 4 horas, se identificó la banda de cadenas alifáticas a 2918 y 2930 cm^{-1} respectivamente.

En el espectro de la fase hexánica para el sistema empleando etanol, (Figura 12b) apareció un pico a 3400 cm^{-1} , que corresponde a un enlace OH, característico en espectros de glicerina [40]. Lo anterior se atribuye al origen de las muestras, las cuales provienen de un proceso polifuncional donde no hubo un proceso de purificación de los productos.

Los espectros infrarrojos obtenidos para lípidos y ésteres etílicos y metílicos, fueron comparados igualmente con espectros IR de lípidos de microalgas, de aceite y ésteres etílicos de palma y soya (Tabla 4).

Tabla 4. Regiones características de espectros de lípidos y biodiesel.

Espectro IR	Vibración	Región [cm⁻¹]		
		Palma [41]	Soya [36]	Microalgas
Lípidos	Enlace carbonilo C=O	1745	1743	1746-1654 [38] 1704*
	Cadenas Alifáticas CH₂-CH₃	2922	2850-2950	3025-2954 [38] 2918*
Ésteres de ácidos grasos	Enlace carbonilo C=O	1750	1740	1750*
	Cadenas Alifáticas CH₂-CH₃	2925	2850-2950	2930*

* En este trabajo. **Fuente:** Los autores.

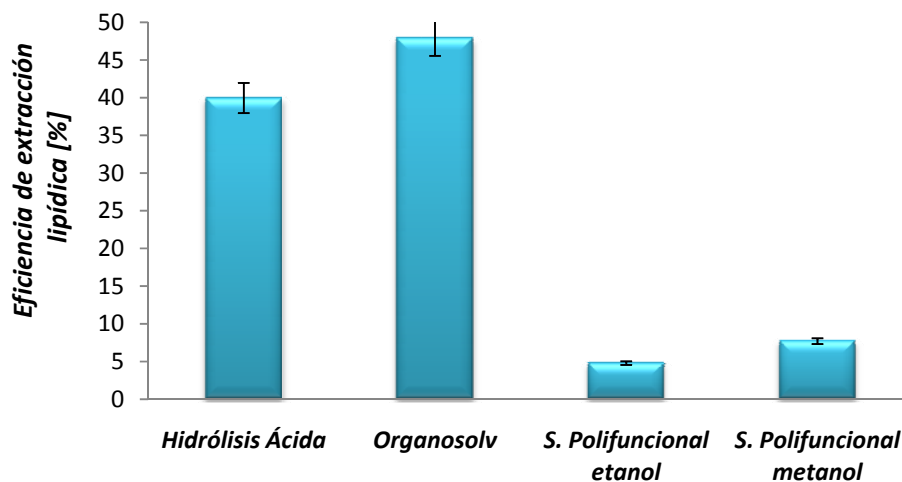
El enlace éster para lípidos de microalgas comprende la región de 1746 a 1654 cm⁻¹ [38], lo cual coincide con la banda encontrada a 1704 cm⁻¹. En el espectro IR para ésteres etílicos a partir de aceite de palma [41] y de la microalga *Navicula* sp., el enlace carbonilo fue identificado a la misma longitud de onda, 1750 cm⁻¹.

Teniendo en cuenta la diferencia de posición de la banda del grupo carbonilo presentada entre el espectro IR para lípidos de *Navicula* sp. y el espectro IR de la muestra de fase hexánica del Sistema Polifuncional, se puede afirmar que ocurrió reacción de transesterificación, y además de lípidos y monosacáridos, por esta ruta se obtuvieron ésteres de ácidos grasos.

3.3 COMPARACIÓN DE RUTAS PARA LA OBTENCIÓN DE LÍPIDOS Y MONOSACÁRIDOS

La biomasa residual de la ruta Sistema Polifuncional fue sometida a extracción Soxhlet con el fin de determinar y cuantificar la cantidad de aceite remanente. Se obtuvo una eficiencia lipídica de 4,8 %, para el sistema empleando etanol, y 7,72% para el sistema empleando metanol (Figura 13). Mediante la ruta Organosolv – Extracción Soxhlet se consiguió una eficiencia lipídica de 47,96 %, y para la ruta de Hidrólisis ácida – Extracción Soxhlet, una eficiencia de 39,98 %.

Figura 13. Eficiencias de extracción lipídica en *Navicula* sp. de las rutas evaluadas.



Fuente: Los autores.

Mediante extracción Soxhlet, hubo una muy baja obtención de aceite a partir de biomasa residual de los sistemas empleando etanol y metanol. Esto confirma entonces, lo demostrado mediante los espectros FTIR; en el transcurso de reacción del Sistema Polifuncional se da la liberación de los lípidos, los cuales quedarían en la fase hexánica de este sistema y serían posteriormente transesterificados. No obstante, si lo que se busca es solo la obtención de estos lípidos, en términos de eficiencia de extracción, la ruta Organosolv – Extracción Soxhlet, sería la más conveniente.

En cuanto a obtención de azúcares reductores totales, en la tabla 5 se presentan los porcentajes obtenidos en cada ruta. Por medio del Sistema Polifuncional, usando metanol, se obtuvo la mayor concentración de azúcares reductores totales, 1,75 %, en comparación con el mismo sistema empleando etanol y las rutas 1 y 2. Siendo esto así, se puede considerar que para obtener mayor porcentaje de ART, la ruta más ventajosa sería el Sistema Polifuncional empleando metanol.

Tabla 5. Porcentajes de obtención de azúcares reductores totales (ART) en *Navicula* sp. de las rutas evaluadas.

Porcentaje de ART obtenido [%]				
	Hidrólisis ácida	Organosolv	Sistema Polifuncional etanol	Sistema Polifuncional metanol
Navicula sp.	0,29	0,98	1,67	1,75

Fuente: Los autores.

4. CONCLUSIONES

Al incrementar el tiempo de operación de los métodos hidrólisis ácida y extracción Soxhlet se aumenta la obtención de aceite en las microalgas del orden Naviculales evaluadas. Mediante la ruta Organosolv – Extracción Soxhlet se obtuvo la eficiencia lipídica más alta respecto a las demás rutas.

Bajo las condiciones evaluadas en el Sistema Polifuncional se obtuvieron tanto azúcares reductores totales como lípidos y alquil-ésteres. Empleando metanol, la producción de ésteres de ácidos grasos se da más rápido, a su vez, se obtiene mayor cantidad de ART en el tiempo respecto a lo que se obtiene en las demás rutas. Altas temperaturas y bajas concentraciones de ácido aumentan la producción de ART para los sistemas estudiados.

La ruta Organosolv – Extracción Soxhlet es la más adecuada para la obtención conjunta a escala laboratorio de metabolitos de microalga *Navicula* sp.; y el Sistema Polifuncional es la ruta que ofrece mayor potencial para un posterior escalamiento del proceso de obtención directa de ésteres de biodiesel y azúcares reductores totales.

5. RECOMENDACIONES

Con el fin de perfeccionar la ruta Sistema Polifuncional, es recomendable desarrollar métodos de separación de lípidos y biodiesel que puedan ser empleados en la fase hexánica de este sistema.

Para futuros estudios cinéticos, utilizar mecanismos más detallados de reacción de conversión material celulósico de microalgas a ART, con el fin de afinar el comportamiento de formación de los azúcares.

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, es recomendable realizar las simulaciones de las rutas promisorias utilizando software especializado a fin de evaluar la factibilidad del escalamiento de este tipo de procesos a nivel industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] AMIN S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. En: Energy Convers Manage. 2009, Vol.50, p.1834–1840
- [2] MATA T.M., MARTINS A.A., CAETANO N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010, Vol.14, p.217–32
- [3] AMARO H.M., GUEDES A.C., MALCATA F.X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. En: Applied Energy. 2011, doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.014
- [4] AHMAD A.L., MAT YASIN N.H., DEREK C.J.C., LIM J.K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2011, Vol.15, p. 584–593
- [5] EHIMEN E.A., SUN Z.F., CARRINGTON C.G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. En: Fuel. 2010, Vol. 89, p.677–684
- [6] FU C.C., HUNG T.C., CHEN J.Y., SU C.H., WUA W.T. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. En: Bioresource Technology. 2010, Vol.101, p.8750–8754
- [7] CASTRO C., VALVERDE M., PAREDES O. Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. En: Ide@s CONCYTEG. 2009, Vol. 54, p.1246-1270
- [8] PRIETO M., MOGOLLON M., ADA C. Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. En: Revista MVZ Córdoba. 2005, vol. 10, p. 544- 554

- [9] Clasificación taxonómica de *Navicula* sp. AYMA. Microorganisms Atlas Algae. Disponible en Internet:
http://personal.telefonica.terra.es/web/ayma/atlas_m.htm
- [10] MILLET M.A., BAKER A.J., SCATTER L.D. Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. En: *Biotechnology & Bioengineering Symposium*. 1976, Vol.6, p. 125–153
- [11] SUBHADRA B.G., EDWARDS M. Coproduct market analysis and water footprint of simulated commercial algalbiorefineries. En: *Applied Energy*. 2011, doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.051
- [12] PACKER M. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. En: *Energy Policy*. 2009, Vol. 37, p.3428–3437
- [13] RABELO S.C., FILHO R.M., COSTA A.C. Lime pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. En: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, Vol. 153, p. 139–150
- [14] GRIMA E.M., BELARBI E.H., ACIÉN FERNÁNDEZ F.G., MEDINA A.R., CHISTI Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. En: *Biotechnology*. 2003, Vol. 20, p.491–515
- [15] VEGA A., BAO M., LAMAS J. Application of factorial design to the modeling of organosolv delignification of *Miscanthus sinensis* (Elephant grass) with phenol and dilute acid solutions. En: *Bioresource Technology*. 1997, Vol.61, p.1–7
- [16] PABON, I. y OSPINA, L. Revisión del estado del arte de la tecnología de explosión a vapor y planteamiento de una estrategia de experimentación al interior del grupo de bioprocesos y flujos reactivos de la Universidad Nacional. Tesis de

pregrado. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia. Escuela de Ingeniería Química, 2009.

[17] FERNANDEZ C.M., RAMOS M.J., PEREZ A., RODRIGUEZ J.F. Production of biodiesel from winery waste: Extraction, refining and transesterification of grape seed oil. En: Bioresource Technology. 2010, Vol. 101, p. 7019-7024

[18] GONZÁLEZ A., KAFAROV V., y GUZMÁN A. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. En: Prospect. 2009, Vol. 7, p. 53-60

[19] ALVA M. Determinación del contenido graso de leche en polvo: extracción Soxhlet. En: Guía de Prácticas de Bromatología. 2004, 2da. Edición. Disponible en Internet:
http://www.profeonline.com/laboratorioquimico/mod_16/docs/practico_soxhlet_grasa_leche_en_polvo.pdf

[20] LUQUE DE CASTRO M.D., PRIEGO-CAPOTE F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. En: Journal of Chromatography A. 2010, Vol. 1217, p. 2383–2389

[21] SOGORB M., VILLAVONA E. Extracción Soxhlet. En: Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias. España: Ediciones Díaz de Santos S.A. 2004, p. 20-22

[22] SARMIENTO R., AMAYA A., GONZÁLEZ A., KAFAROV V. Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas empleando disrupción celular térmica y química. En: memorias del XXIX Congreso Latinoamericano de Química. Cartagena, Colombia, septiembre 27 a Octubre 01. 2010, p 100

[23] CÓRDOBA, L.S., LÓPEZ, L.M. Obtención de aceite de microalgas nativas mediante la combinación de disrupción celular y método de extracción soxhlet

para la producción de biodiesel. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, 2010. 45p.

[24] MEZA, P., SEPÚLVEDA, A. Estudio del pretratamiento metanol-ácido de la microalga *Chaetoceros gracilis* para la obtención de azúcares reductores totales. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química, 2010. 50p.

[25] JARAMILLO, M.I., MANTILLA, N.M. 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. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química, 2010. 58p.

[26] MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. En: Analytical Chemistry. 1959, Vol.31, p. 426-428

[27] CÓRDOBA, L.S., LÓPEZ, L.M., GONZÁLEZ, A.D., KAFAROV, V. Obtención de aceite de microalgas nativas a escala de laboratorio mediante la combinación de disrupción celular y método de extracción Soxhlet para la producción de biodiesel. En: memorias del XXIX Congreso Latinoamericano de Química. Cartagena, Colombia, septiembre 27 a Octubre 01, 2010, p. 103

[28] Clasificación taxonómica de *Navicula* sp. Diatomeas. Disponible en Internet: http://algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43698&sk=0

[29] Clasificación taxonómica de *Amphiprora* sp. Ehrenberg, 1843. Disponible en Internet: http://algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43728&sk=0

- [30] GONZÁLEZ A. D., KAFAROV V. Design of a multifunctional reactor for third generation biofuels production. En: Chemical Engineering Transactions. 2010, Vol. 21, p.1297-1302
- [31] PLATA V., KAFAROV V., MORENO N. Optimization of third Generation biofuels production: Biodiesel from microalgae oil by homogeneous transesterification. En: Chemical Engineering Transactions. 2010, Vol. 21, p.1201-1206
- [32] JOHNSON M.B., WEN Z. Production of Biodiesel Fuel from the Microalga *Schizochytrium limacinum* by Direct Transesterification of Algal Biomass. En: Energy Fuels. 2009, Vol. 23, p. 5179-5183
- [33] SAEMAN W.C. Passage of solids through rotary kilns: factors affecting time passage. En: Chemical Engineering Progress. 1951, Vol. 47, p. 508
- [34] TÉLLEZ S.J., RAMÍREZ J.A., VELÁSQUEZ M.V. Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum Straw. En: Journal of Food Engineering. 2002, Vol. 52, p.285–291
- [35] VERVERIS C., GEORGHIOU K., DANIELIDIS D., HATZINIKOLAOU D.G., SANTAS P., SANTAS R., CORLETI V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. En: Bioresource Technology. 2007, Vol.98, p.296–301
- [36] PEDROSO L.M., FERREIRA J. L., FALCÃO J., SIMÕES P.N., SIMÃO A.V., PORTUGAL A. Biodiesel – alternative fuel. Grupo de Computação, Estatística e Materiais (CEM), Departamento de Engenharia Química. Universidade de Coimbra, Portugal. Disponible en Internet:
http://www.eq.uc.pt/cem/glicerol/LMP_Chempor_05-1.pdf

- [37] ALISKE M.A., ZAGONEL G.F., COSTA B.J., VEIGA W., SAUL C. K. Measurement of biodiesel concentration in a diesel oil mixture. En: Fuel. 2007, Vol. 86, p.1461-1464
- [38] LAURENS L.M., WOLFRUM E.J. Feasibility of Spectroscopic Characterization of Algal Lipids: Chemometric Correlation of NIR and FTIR Spectra with Exogenous Lipids in Algal Biomass. En: Bioenergy Research. 2010, DOI 10.1007/s12155-010-9098-y
- [39] PASTO D., JOHNSON C., MILLER M. *Experiments and Techniques in Organic Chemistry*. Prentice Hall, New Jersey. 1992, 545p.
- [40] OOI T.L., YONG K.C., DZULKEFLY K., WAN YUNUS W.M.Z., HAZIMAH A.H. Crude glycerine recovery from glycerol residue waste from a palm kernel oil methyl ester plant. En: Journal of Oil Palm Research. 2001, Vol. 13, p.16-22
- [41] MARTINEZ O.M., SANCHEZ F.J., SUAREZ O.Y. Producción de ésteres etílicos a partir de aceite de palma RBD. En: Ingeniería e investigación. 2007, Vol. 27, p.34-43
- [42] PEREZ, S. Culturing algae. Recuperado el 12 de diciembre de 2009. Disponible en internet:
<http://people.oregonstate.edu/~weisv/Protocols/Symbiodinium/Algal%20cultures.pd>

ANEXOS

ANEXO A: CONTENIDO DE LÍPIDOS, CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS DE ALGUNAS ESPECIES DE MICROALGAS

Las microalgas pueden producir diferentes clases de lípidos, carbohidratos y proteínas dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo empleadas, tales como, pH, temperatura, tiempo de cultivo, etc. A continuación se presenta una lista de diferentes especies de microalgas y su respectivo contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas.

Tabla A1. Contenido lipídico de algunas microalgas.

<i>Microalga</i>	<i>Contenido de Aceite peso seco [%]</i>
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

Fuente: CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. En: Biotechnology Advances. 2007, Vol. 25, p.294-306

Tabla A2. Contenido de proteínas y carbohidratos presentes en algunas cepas de microalgas.

<i>Cepa</i>	<i>Proteínas peso seco [%]</i>	<i>Carbohidratos peso seco [%]</i>
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	10–17
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	–
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8–18	21–52
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	12–17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26
<i>Spirogyra</i> sp	6–20	33–64
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4
<i>Dunaliella salina</i>	57	32
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–18
<i>Prymnesium parvum</i>	28–45	25–33
<i>Tetraselmis maculate</i>	52	15
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–45	40–57
<i>Spirulina platensis</i>	52	8–14
<i>Spirulina maxima</i>	28–39	13–16
<i>Synechoccus</i> sp.	46–63	15
<i>Anabaena cylindrical</i>	43–56	25–30

Fuente: JASVINDER, S., SAI G. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. Energy Technology Research Group, School of Engineering Sciences, University of Southampton, 2010.

ANEXO B: IMÁGENES DE LOS GÉNEROS DE MICROALGAS EMPLEADOS

Figura B1. *Amphiprora* sp.



Fuente: <http://www.mikroskopie-ph.de/Amphiprora-2-G.jpg>

Figura B2. *Navicula* sp.



Fuente: www.eyeofsciencie.com/eos_html/frame1.html

ANEXO C: MEDIO DE CULTIVO F/2
(Guillard y Ryther, 1962. Guillard 1975)

A 950 mL de agua de mar adicionar los siguientes componentes [42]:

Tabla C1. Composición del medio F/2.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad [mL]</i>	<i>Solución Stock [g/L DH₂O]</i>	<i>Concentración molar en el medio final [M]</i>
NaNO₃	1	75	8,83 x 10 ⁻⁴
NaH₂PO₄ · H₂O	1	5	3,63 x 10 ⁻⁵
Na₂SiO₃ · 9H₂O*	1	30	1,07 x 10 ⁻⁴
Solución de trazas metálicas	1	Mirar tabla C2	-----
Solución de vitaminas	0,5	Mirar tabla C3	-----

Fuente: <http://people.oregonstate.edu/~weisv/Protocols/Symbiodinium/Algal%20cultures.pdf>

Después de adicionar los componentes, llevar el volumen a un litro con agua de mar filtrada y autoclavar.

A 950 mL de agua destilada adicionar los siguientes metales [42]:

Tabla C2. Composición de trazas metálicas para el medio F/2.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Solución Stock [g/L DH₂O]</i>	<i>Concentración molar en el medio final [M]</i>
FeCl₃ · 6H₂O	3,15 g	-----	1,17 x 10 ⁻⁵
Na₂EDTA · 2H₂O	4,36 g	-----	1,17 x 10 ⁻⁵
CuSO₄ · 5H₂O	1 mL	9,8	9,10 x 10 ⁻⁷
Na₂MoO₄ · 2H₂O	1 mL	6,3	7,65 x 10 ⁻⁸
ZnSO₄ · 7H₂O	1 mL	22	4,20 x 10 ⁻⁸
CoCl₂ · 6H₂O	1 mL	10	3,93 x 10 ⁻⁸
MnCl₂ · 4H₂O	1 mL	180	2,60 x 10 ⁻⁸

Fuente: <http://people.oregonstate.edu/~weisv/Protocols/Symbiodinium/Algal%20cultures.pdf>

Llevar el volumen final a 1 L y autoclavar.

A 950 mL de agua de agua destilada adicionar las siguientes vitaminas [42]:

Tabla C3. Composición de vitaminas para el medio F/2.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad [mL]</i>	<i>Solución Stock [g/L DH₂O]</i>	<i>Concentración molar en el medio final [M]</i>
<i>Vitamina B12*</i>	1	1	1×10^{-10}
<i>Biotina</i>	10	0,1	2×10^{-9}
<i>Tiamina * HCl</i>	200	-----	3×10^{-7}

*Cianocobalamina

Fuente: <http://people.oregonstate.edu/~weisv/Protocols/Symbiodinium/Algal%20cultures.pdf>

Llevar el volumen final a 1 L con agua destilada. Autoclavar y guardar refrigerado.

NOTA: La vitamina B12 y la biotina son obtenidas en forma cristalina. Cuando se prepara la solución stock de vitamina B12, puede contener aproximadamente 11% de agua de cristalización (Por cada mg de vitamina B12, adicionar 0,89 mL de agua destilada). Cuando se prepara la solución stock de biotina, puede contener aproximadamente 4% de agua de cristalización (Por cada mg de biotina, adicionar 9,6 mL de agua destilada) [42].

ANEXO D: PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LAS MICROALGAS EMPLEADAS

Tabla D1. Ácidos grasos insaturados de *Navicula* sp. y *Amphiprora* sp.

<i>Estructura</i>	<i>Ácido graso</i>	<i>Navicula</i> sp. [%]	<i>Amphiprora</i> sp. [%]
<i>Mono-insaturados</i>			
<i>C14:1n5</i>	<i>Miristoleico</i>	0,0	0,0
<i>C15:0</i>	<i>Pentadecanoico</i>	3,2	1,4
<i>C16:1</i>	<i>Palmitoleico</i>	0,0	0,0
<i>C18:1</i>	<i>Oleico</i>	4,3	5,9
<i>C18:1n9t</i>	<i>Elaidico</i>	1,0	3,3
<i>C20:3</i>	<i>Eicosatrienoico</i>	0,0	0,0
<i>Di-Insaturados</i>			
<i>C18:2n9,12t</i>	<i>Linoeladico</i>	11,9	31,7
<i>C18:2</i>	<i>Linoleico</i>	17,5	15,2
<i>C22:2</i>	<i>Docosadienoico</i>	1,7	3,9
<i>C20:2n11,14c</i>	<i>Eicosanodioico</i>	3,8	3,7
<i>Tri-Insaturados</i>			
<i>C18:3</i>	<i>Gamma-Linolenico</i>	2,4	4,6
<i>C18:3</i>	<i>Linolenico</i>	0,7	0,0
<i>C20:3</i>	<i>Eicosatrienoico</i>	0,0	0,0

Fuente: Datos tomados del informe de caracterización del microalgas del Instituto Colombiano del Petróleo.

Tabla D2. Ácidos grasos saturados de *Navicula* sp. y *Amphiprora* sp.

Estructura	Ácido graso	Navicula sp. [%]	Amphiprora sp. [%]
C10:0	Decanoico	0,0	0,0
C11:0	Undecanoico	1,3	0,1
C12:0	Laurico	1,1	0,4
C13:0	Tridecanoico	4,3	1,0
C14:0	Mirístico	18,1	9,0
C18:0	Estearico	0,0	0,1
C15:1n10c	Pentadecenoico	1,4	2,2
C16:0	Palmitico	14,3	5,5
C17:1n10c	Heptadecenoico	1,2	0,0
C20:0	Araquídico	0,0	1,2

Fuente: Datos tomados del informe de caracterización de microalgas del Instituto Colombiano del Petróleo.

ANEXO E: REACTIVOS UTILIZADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN

Tabla E1. Reactivos químicos empleados en el desarrollo experimental.

<i>Reactivo:</i>	<i>Etanol</i>	<i>Metanol</i>	<i>Hexano</i>	<i>Ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS)</i>	<i>Ácido Clorhídrico</i>	<i>Ácido Sulfúrico</i>
<i>Fórmula Química</i>	CH ₃ CH ₂ OH	CH ₃ OH	C ₆ H ₁₄	C ₇ H ₄ N ₂ O ₇	HCl	H ₂ SO ₄
<i>Masa Molecular [g]</i>	46,1	32,0	86,2	228,12	36,5	98,1
<i>Gravedad Específica (Agua=1) a 20 °C</i>	0,793	0,79	0,66	-----	1,19	1,84
<i>Punto de Ebullición [°C] a 1 atm</i>	78,3	64,5	69	-----	-----	-335
<i>Índice de polaridad</i>	5,2	5,1	0,0	-----	-----	-----
<i>Punto de Fusión [°C]</i>	-114,5	-98	-94,3	174	-----	-3
<i>Presión de Vapor [hPa] a 20 °C</i>	59	128	160	-----	190	-0,0001
<i>Punto de Inflamación [°C]</i>	12	11	-22	-----	-----	-----

Fuente: Catálogo de reactivos y productos 2008-2010 de MERCK.

ANEXO F: EQUIPOS UTILIZADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN

EQUIPO	ESPECIFICACIÓN
 A white analytical balance with a digital display showing '5056.1'. The balance is on a stand with a glass enclosure.	<p>Balanza analítica</p> <p>Serie 320XB, marca Precisa Gravimetrics AG, máx 220 g, e = 0,001 g, mín 0,01 g, d = 0,0001 g.</p>
 A white heating mantle with a black top ring and a control knob on the front. The brand name 'Heating Mantle' is visible on the front panel.	<p>Manta de Calentamiento</p> <p>Marca Electrothermal, 110/120 V, 50/60 Hz, 150 W.</p>
 A blue magnetic stirrer/heating plate with a white top surface. It has a digital display and a control knob on the front panel.	<p>Plancha de calentamiento con agitación</p> <p>Modelo MSH-20D, marca WISESTIR, 380°C, 80-1500 rpm, 110 V, 1,2 Kw.</p>



Bomba de extracción

Marca Emerson, 115 V, 60 Hz, 1725 rpm, 1/6 HP.



Equipo Soxhlet

Matraz fondo plano capacidad 500 mL con esmerilado 24/40.

Tubo extractor Soxhlet capacidad 250 mL con esmerilado 45/40 – 24/40.

Condensador de bolas con esmerilado 45/40.



Autoclave cilíndrica

Modelo 25-X, marca ALL AMERICAN, capacidad 25 L, 110 V, 60 Hz, 8,75A, 1050 W.



Horno digital de convección

Marca WTC binder, 115 V, 60 Hz, 1,20 kW,
temperatura máxima 300 °C.



Centrífuga

Modelo PowerSpin TM, marca Unico, 24 Tubos,
1000-3400 rpm, 115V, 60Hz.



Espectrofotómetro FTIR

FTIR-8400S, marca Shimadzu, rango de longitud
de onda 400-4000 cm^{-1} , Software IRSolution,
celda KBr de 2,5 cm de diámetro.



Espectrofotómetro UV visible

Spectroquant Pharo 3000, marca MERCK,
cubetas rectangulares 20mm.

ANEXO G: MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES (ART)

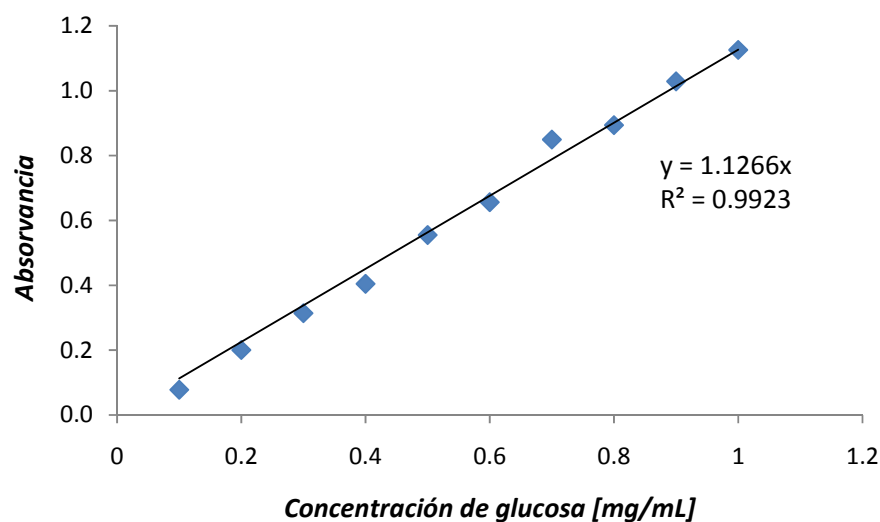
La cuantificación de azúcares reductores se realizó utilizando el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que consiste en incubar las muestras del licor obtenido en los pretratamientos y en el Sistema Polifuncional, y el reactivo DNS seguidos por la medición de absorbancia (Longitud de onda de máxima absorción de 540 nm) de la solución y así determinar la concentración de azúcares reductores. Estos azúcares reductores reaccionan con el DNS dando como producto el compuesto 3-amino-5-nitrosalicilate. La absorbancia guarda una relación directamente proporcional a la concentración molar de los azúcares reductores.

Preparación del DNS: Para la preparación de 1 L de DNS, tomar un vaso de precipitado forrado con papel aluminio, adicionar 400 mL de agua destilada y calentar a 50°C manteniendo la temperatura constante durante toda la preparación; agregar lentamente 10 g de DNS. Adicionalmente, preparar una solución con 16 g de NaOH y 200 mL de agua destilada. Agregar la solución básica al vaso de precipitado que contiene la solución de DNS. Añadir 300 g de Tartrato de Sodio y Potasio. Esperar hasta obtener una mezcla homogénea, la cual se afora hasta 1000 mL, dejar reposar y finalmente almacenar en un frasco ámbar.

Curva de calibración: La curva de calibración se realiza con glucosa. Se preparan 10 mL de solución de glucosa con una concentración de 1mg/mL. De la solución existente de glucosa (1mg/mL), se preparan soluciones de glucosa de 0 a 1 mg/mL, con intervalos de 0,1 mg*mL. A cada tubo se adiciona 0,5 mL del reactivo DNS, se agitan manualmente y se llevan a un baño maría (100°C) durante 5 min. Los tubos se transfieren rápidamente a un baño de hielo (4°C) para detener la reacción. Una vez enfriada la solución, se adiciona a cada tubo 5 mL de agua destilada. Se deja en reposo durante 15 min, y posteriormente se leen en el

espectrofotómetro, se obtienen las absorbancias para cada concentración de glucosa, con estos datos se realiza la curva de calibración.

Figura G1. Curva de calibración del DNS.



Fuente: Los autores.

Preparación de las muestras para la determinación de azúcares reductores:

Tomar 0,5 mL de muestra en un tubo de ensayo (licor de los pretratamientos y muestras con fase hidroalcohólica del Sistema Polifuncional). Con 0,05 mL de NaOH se ajusta el pH entre 6 y 7. A cada tubo de ensayo con la muestra, se le adiciona 0,5 mL de reactivo DNS, se agitan manualmente y se llevan a baño maría (100°C) durante 5 min. Los tubos se transfieren rápidamente a un baño de hielo (4°C) y se les adiciona a cada uno, 5 mL de agua destilada. La absorbancia se mide a 540 nm y la concentración de las muestras se determina por la ecuación de la recta. Las muestras se preparan con su respectiva réplica y como blanco se usa agua destilada.

ANEXO H: PROTOCOLO DEL SISTEMA POLIFUNCIONAL

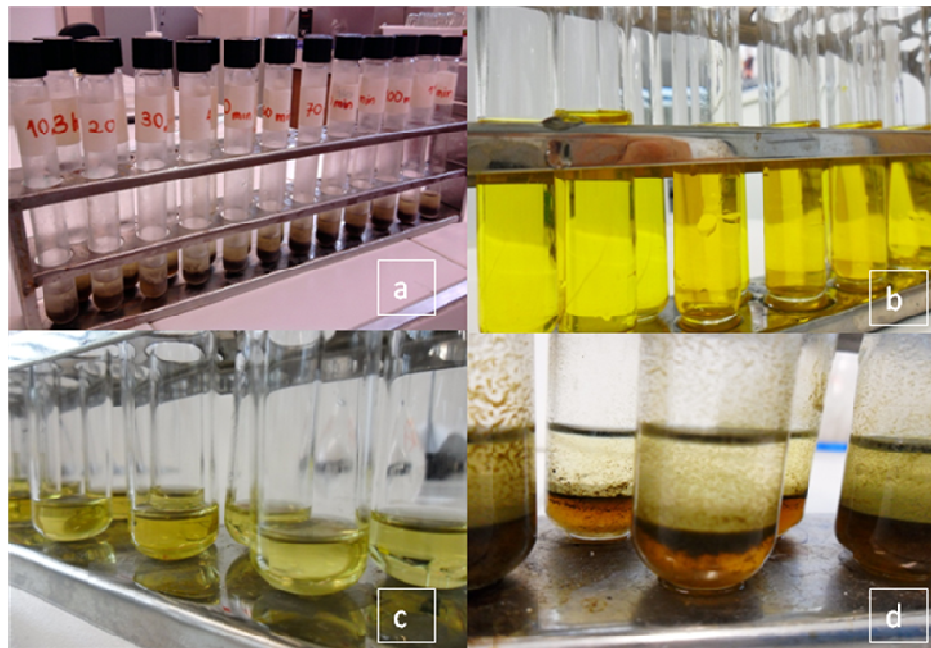
1. Homogenizar la biomasa seca.
2. Pesar 25 g de biomasa macerada (relación 1:6 con el alcohol).
3. Adicionar al bioreactor la biomasa y 167 mL de alcohol.
4. Agregar 1,84 mL de ácido sulfúrico como catalizador (relación 1:1 con respecto a la cantidad de aceite contenida en la biomasa)
5. Someter la solución a calentamiento (60°C) y agitación constante (500 rpm).
6. A intervalos de tiempo variables, tomar una alícuota de 0,7 mL de la solución.
7. Enfriar la muestra en baño de hielo a 4 °C durante 1 min con el fin de detener la reacción.
8. Centrifugar durante 15 min a 3400 rpm.
9. Separar la biomasa residual del licor sobrenadante.
10. Neutralizar el licor, empleando 0,05 mL de NaOH con el fin de evitar la degradación de los azúcares presentes.
11. Para la separación de las fases agregar 0,5 mL de agua destilada y 1,5 mL de hexano, agitar y dejar reposar hasta la formación de dos fases (hidroalcohólica y hexánica).
12. Con una pipeta separar la fase hidroalcohólica (fase inferior).
13. Realizar a la fase hidroalcohólica la prueba de DNS para la cuantificación de ART; y a la fase hexánica, espectroscopia de infrarrojo para la determinación de formación de esteres de ácidos grasos.

Figura H1. Bioreactor del Sistema Polifuncional.



Fuente: Los autores.

Figura H2. Muestras obtenidas del Sistema Polifuncional.



a) Muestras obtenidas del Sistema Polifuncional. b) Muestra de la fase hidroalcohólica con reactivo DNS. c) Fase hexánica. d) Muestras con fase hexánica, biomasa residual y fase hidroalcohólica.

Fuente: Los autores.

ANEXO I: CÓDIGOS EMPLEADOS EN MATLAB

Ecuación 2.6:

```
function Cart=ccion(k1,k2,t)

Cart=25.3208*k1/(k2-k1)*(exp(-k1*t)-exp(-k2*t));
```

Cálculo del error absoluto:

```
function errores=err(T,CART)
[n,m]=size(T);
for i=1:1000                                % iteracion para k1

    for j=1:1000                            %iteracion para k2
        suma=0;
        for t1=1:m    % sumatoria de los valores
            sum1=abs(CART(t1)-ccion(i*1e-4,j*1e-4,T(t1)));
            suma=suma+sum1;
        end
        errores(i,j)=suma;
    end
end
```

Menor error absoluto:

```
function muestrre(k1,k2,T,CART)

hold off

plot(T,CART)

[n,m]=size(T)

hold on
for i=1:m
    Cart(i)=ccion(k1*1e-3,k2*1e-3,T(i));
end
plot (T,Cart)
```