

**COMPARACIÓN DE METODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE  
MICROALGAS A ESCALA LABORATORIO PARA LA PRODUCCIÓN DE  
BIODIESEL.**

**JAIRO ANDRÉS GARCÍA HERNÁNDEZ**

**JESÚS HERNANDO MIRANDA CÁRDENAS**

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

**2011**

**COMPARACIÓN DE METODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE  
MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL.**

**JAIRO ANDRÉS GARCÍA HERNÁNDEZ**

**JESÚS HERNANDO MIRANDA CÁRDENAS**

**Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de  
Ingeniero Químico**

**Director**

**VIATCHESLAV KAFAROV**

**Ingeniero Químico Dr. Sc.**

**Co-director**

**ANGEL DARIO GONZALEZ**

**Ingeniero Químico.**

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

**2011**

## **DEDICATORIA**

*A **Dios** por ser mi constante guía  
y por darme las fuerzas para afrontar cada etapa de este proceso.*

*A mi madre **Nury**  
Por todo su amor, esfuerzo, dedicación y apoyo cuando decidí empezar este reto.*

*A mi padre **Pedro Antonio (Q.E.P.D)**  
Quien no está conmigo en este momento pero sé que en mi corazón siempre me acompañara.*

*A **Yeni Milenita**  
Por ser la mujer q me ha acompañado en los buenos y malos momentos, por darme las fuerzas para seguir adelante y es a su lado con quien quiero hacer realidad todos mis sueños.*

*A mis hermanas **Jaqueline y Carolina**  
Por sus consejos y palabras de aliento.*

*A mis amigos **Carlos Alberto, Melejita y Oscar Iván.**  
Por todos los momentos vividos durante estos años.*

*A **Jesús Hernando**  
Por su amistad y por todos los momentos que compartimos durante la realización de este proyecto.*

**JAIRO ANDRÉS GARCÍA**

## *Dedicatoria*

*Dedico este logro a mis padres Hernando de Jesús Miranda y Luz Mary Cárdenas por ser quienes han estado a mi lado en todo momento dándome los consejos y la fuerza necesaria para continuar rompiendo todas las barreras que he encontrado en mi vida y las que encontrare, además soy la persona que soy gracias a que ellos existieron en todo momento y me formaron mental y emocionalmente.*

*A mis hermanos Claudia Jazmín, Iván Camilo y a mi sobrina Daniela quienes con su apoyo emocional y confianza me impulsaron a conseguir este logro.*

*A Erika Amaya quien con su amor, comprensión y paciencia me apoyo incondicionalmente en todo momento.*

*A mis amigos, por todas las experiencias compartidas, especialmente a Jairo Andrés García por su amistad en gran parte de la carrera.*

*Y a todas las demás personas que me apoyaron de una u otra manera, a todas gracias.*

*Jesús Hernando Miranda Cárdenas*

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a:

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el apoyo brindado mediante el proyecto — Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel código 2008D32006-6710.

Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL por los aportes en conocimiento y experiencia de sus profesionales.

La Corporación Instituto Morrosquillo por suministrar la materia prima con la cual se desarrolló el proyecto.

Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov por su valioso aporte y constante colaboración durante la realización del proyecto de investigación.

Ing. Ángel Darío González por su dedicación y apoyo incondicional en el desarrollo del presente trabajo investigativo.

La Universidad Industrial de Santander, los profesores de Ingeniería Química, y todas aquellas personas que hicieron parte nuestra formación profesional.

Eduardo Carreño y Wilson Carreño técnicos del laboratorio de procesos de Ingeniería Química, por su ayuda, enseñanzas y orientación durante la ejecución de las pruebas experimentales.

Ing. Liliana del Pilar Castro por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo investigativo.

Nuestros amigos y compañeros de estudio por su comprensión y compañía.

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>1. CONCEPTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>17</b>
1.1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS. ....	17
1.1.1 Descripción de los géneros de microalgas utilizadas. ....	17
1.1.1.1 <i>Amphiprora</i> sp. Ehrenberg, 1843. ....	17
1.1.1.2 <i>Nannochloropsis</i> sp. D.J. Hibberd, 1981 .....	18
1.1.1.3 <i>Navicula</i> sp. Bory de Saint-Vincent, 1822.....	18
1.2 CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE DE MICROALGAS. ....	18
1.3 OBTENCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS. ....	18
1.3.1 Disrupción celular. ....	19
1.3.2 Extracción.....	19
1.3.2.1 Soxhlet. ....	19
1.3.2.2 Bligh & Dyer.....	20
1.3.2.3 Etanol-Hexano.....	20
1.3.2.4 Métodos in situ.....	20
<b>2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>21</b>
2.1 MATERIALES.....	21
2.1.1 <i>Materia Prima</i> .....	21
2.2 REACTIVOS Y EQUIPOS.....	21
2.2.1 Reactivos.....	22
2.2.2 Equipos.....	22
2.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	22
2.3.1 <i>Disrupción Celular</i> .....	22
2.3.2 <i>Métodos de Extracción empleados</i> . ....	23
2.3.2.1 Soxhlet. ....	23
2.3.2.2 Bligh & Dyer modificado.....	23
2.3.2.3 Extracción In Situ.....	24
2.3.2.4 Extracción con Etanol-Hexano. ....	24
2.3.3 <i>Cuantificación del extracto</i> . ....	25
2.4 ESTUDIO ESTADÍSTICO .....	26
<b>3. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b> .....	<b>27</b>
3.1 RENDIMIENTO DE LA DISRUPCIÓN CELULAR. ....	27
3.2 RENDIMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA HIDROLIZADA .....	28
3.3 COMPARACIÓN DEL MÉTODO BLIGH & DYER MODIFICADO.....	34
3.4 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS SOXHLET E IN SITU CICLOHEXANO CON BLIGH & DYER MODIFICADO.....	36
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	<b>39</b>
<b>5. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>41</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>47</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metodología experimental desarrollada .....	21
Figura 2: Diagrama de bloques método de disrupción celular.....	22
Figura 3: Diagrama de bloques Soxhlet .....	23
Figura 4: Diagrama de bloques Bligh and Dyer.....	24
Figura 5: Diagrama de bloques In Situ .....	24
Figura 6: Diagrama de bloques Etanol-Hexano.....	25
Figura 7: Metodología para la comparación de métodos. ....	26
Figura 8: Rendimiento de hidrolisis acida.....	28
Figura 9: Eficiencia de extracción para el género <i>Amphiprora</i> sp. ....	29
Figura 10: Gráfico de Medias para el género <i>Amphiprora</i> sp.....	30
Figura 11: Eficiencia para el género <i>Nannochloropsis</i> sp.....	31
Figura 12: Gráfico de Medias para el género <i>Nannochloropsis</i> sp.....	32
Figura 13: Eficiencia para el género <i>Navicula</i> sp. ....	33
Figura 14: Gráfico de Medias para el género <i>Navicula</i> sp.....	33
Figura 15: Gráfico de Medias para el método Bligh & Dyer.....	35
Figura 16: Gráfico de Medias para los métodos Soxhlet, B&D e In Situ Ciclohexano.....	37

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización taxonómica y fisicoquímica de los géneros estudiados .	27
Tabla 2. Prueba de Múltiples Rangos para el género <i>Amphiprora</i> sp. ....	30
Tabla 3. Prueba de Múltiples Rangos para el género <i>Nannochloropsis</i> sp. ....	32
Tabla 4. Prueba de Múltiples Rangos para el género <i>Navicula</i> sp. ....	34
Tabla 5. Prueba de Múltiples Rangos para el método Bligh & Dyer .....	35
Tabla 6. Extracto Lipídico del método por género. ....	36
Tabla 7. Prueba de Múltiples Rangos para los métodos Soxhlet, B&D e In Situ Ciclohexano. ....	37
Tabla 8. Reactivos químicos empleados en el desarrollo experimental. ....	47

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: FICHA TÉCNICA DE LOS REACTIVOS. ....	47
ANEXO B: PRINCIPALES EQUIPOS EMPLEADOS. ....	48
ANEXO C: PRETRATAMIENTO HIDRÓLISIS ACIDA. ....	50
ANEXO D: EXTRACCIÓN DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO SOXHLET. ....	52
ANEXO E: EXTRACCIÓN DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO BLIGH & DYER. ...	54
ANEXO F: EXTRACCIÓN DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO IN SITU.....	57
ANEXO G: EXTRACCIÓN DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO ETANOL-HEXANO. .....	59
ANEXO H: EXTRACTOS LIPÍDICOS.....	61

## RESUMEN

**TÍTULO:** COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS A ESCALA LABORATORIO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL \*

**AUTORES:** JAIRO ANDRÉS GARCÍA HERNÁNDEZ\*\*

JESUS HERNANDO MIRANDA CARDENAS\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Análisis estadístico, *Amphiprora* sp., *Nannochloropsis* sp., *Navícula* sp., disrupción celular, métodos de extracción, lípidos.

### CONTENIDO

En la actualidad, los altos precios mundiales de los combustibles sumados a los graves prejuicios ambientales por emisión de dióxido de carbono han motivado el interés de los especialistas por los biocombustibles como alternativas energéticas a los combustibles fósiles. Entre las opciones más prometedoras como fuente de energía se encuentran las microalgas. Se ha demostrado que la biomasa de las microalgas puede proporcionar diversos productos ricos en energía, éstos incluyen metano producido por la digestión anaeróbica de la biomasa, biodiesel derivado de aceite microalgal, biohidrógeno y bioetanol producido fotobiológicamente.

En la producción de biodiesel a partir de microalgas, las etapas de disrupción celular y extracción de lípidos son importantes para la obtención de aceites que pueden ser transesterificados a biodiesel. En este trabajo se aplicó los métodos de extracción Soxhlet, Bligh and Dyer, Etanol-Hexano, In Situ Hexano e In Situ Ciclohexano, utilizando los géneros de microalgas nativas *Amphiprora* sp., *Nannochloropsis* sp., *Navícula* sp., las cuales se someten a una etapa de disrupción celular (Hidrólisis acida excepto para el método Bligh and Dyer) para posterior análisis estadístico, el cual se lleva a cabo con el software STATGRAPHICS Centurion XV, utilizando la herramienta “comparación de varias muestras” el cual analiza las medianas y las medias de cada uno de los extractos lipídicos obtenidos en los diferentes métodos aplicados a los distintos géneros de microalgas, esta herramienta indica si entre el par de métodos hay diferencias estadísticamente significativas lo cual es de gran importancia para definir cuál método es aplicable en cada género de microalgas.

---

\*Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Viatcheslav Kafarov. Ingeniero Químico Dr.Sc. Co-Director: Ingeniero Químico. Ángel Darío González.

## ABSTRACT

**TITLE:** STATISTICAL COMPARISON OF LAB-SCALE MICROALGAE CELL DISRUPTION/OIL EXTRACTION METHODS FOR BIODIESEL PRODUCTION.\*

**AUTHORS:** JAIRO ANDRÉS GARCÍA HERNÁNDEZ\*\*

JESUS HERNANDO MIRANDA CARDENAS\*\*

**KEYWORDS:** statistical analysis, *Amphiprora* sp., *Nannochloropsis* sp., *Navicula* sp., cell disruption, extraction methods, lipids.

## CONTENT

Currently, high global fuel prices have attracted the interest of specialists in biofuels as energy alternatives to fossil fuels. Among the most promising options for energy are microalgae. It has been shown that microalgae biomass may provide different energy-rich products; these include methane produced by anaerobic digestion of biomass, biodiesel based on microalgae oil, bioethanol and photobiological biohydrogen.

In the production of biodiesel from microalgae, the stages of cell disruption and extraction of lipids are important for the production of oils that can be transesterified to biodiesel. In this paper the authors applied Soxhlet, Modified Bligh and Dyer, Ethanol-hexane, In situ hexane and In situ cyclohexane oil extraction methods, using the native genera of microalgae *Amphiprora* sp., *Nannochloropsis* sp., *Navicula* sp., which is undergoing a stage of cell disruption (acid hydrolysis except for the Bligh and Dyer method) for subsequent statistical analysis, which is carried out with the software STATGRAPHICS Centurion XV, looking at the medians and means of each of the lipid extracts obtained from different methods applied to different kinds of algae.

It is shown that there are no significant differences between Soxhlet extraction and In situ cyclohexane methods for *Amphiprora* sp., also, for *Navicula* sp., two extraction methods described above shows similar efficiencies to the widely used Bligh and Dyer's method.

---

\*Graduation Project

\*\* Physical and Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Director: Viatcheslav Kafarov. Chemical Engineer Dr.Sc. Co-Director: Chemical Engineer. Ángel Darío González.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el aumento de los precios de los combustibles a nivel mundial, sumado entre otros al impacto ambiental producido por la emisión de dióxido de carbono, han incrementado el interés de los especialistas por los biocombustibles. Al parecer, las características de estos últimos los convierten en una mejor alternativa energética frente a los combustibles fósiles. Entre las opciones más prometedoras como fuente de energía se encuentran las microalgas, dado que se ha demostrado que su biomasa puede proporcionar diversos productos ricos en energía, tales como: metano producido por la digestión anaeróbica de la biomasa, biodiesel derivado de aceite microalgal, biohidrógeno y bioetanol producido fotobiológicamente [6]. En esta búsqueda, el Ministerio de Agricultura junto con el Instituto Colombiano de Petróleo (ICP), la Corporación Instituto de Morrosquillo y la Universidad Industrial de Santander, han comenzado a estudiar el potencial de las microalgas como materia prima para desarrollar nuevas fuentes de energía [38]. El interés que despiertan estos microorganismos es que, además de necesitar pequeñas extensiones para cultivo, su crecimiento se realiza en agua de desechos industriales, aguas residuales y en todas las fuentes de agua [22]. Asimismo, otra de las ventajas es que reducen las concentraciones de gases de efecto invernadero, al captar el dióxido de carbono como nutriente para su crecimiento [11]. Las microalgas pueden asegurar una gran cantidad de biodiesel por su alto contenido de lípidos, el cual supera a todas las fuentes de biodiesel utilizadas en la actualidad [25].

El objetivo principal de este trabajo es comparar los diferentes métodos de extracción de aceite de microalgas. De esta manera, se busca generar conclusiones relacionadas con su empleo y seleccionar así, el método más adecuado desde el punto de vista de eficiencia de extracción, calidad del extracto y aplicabilidad a microalgas de características diferentes. Dichos métodos ya han sido estudiados y evaluados dentro del proyecto denominado “Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel” (Soxhlet, Bligh and Dyer, Etanol-Hexano, In Situ Hexano, In Situ Ciclohexano) en donde se han empleado los géneros nativos *Amphiprora* sp., *Nannochloropsis* sp., y *Navicula* sp.

## 1. CONCEPTOS TEÓRICOS

En este capítulo se presentan aspectos generales de las microalgas y de los géneros utilizados, así como las principales características del aceite proveniente de esta materia prima. Igualmente, se describen generalidades de los métodos de extracción utilizados.

### 1.1 Generalidades de las microalgas.

Las microalgas fueron los primeros organismos con capacidad de realizar fotosíntesis y uno de los agentes en la creación de la actual atmósfera terrestre. Estos organismos son claves en el equilibrio planetario, ya que determinan en gran medida la dinámica del dióxido de carbono en la tierra y además, constituyen la base de las cadenas alimenticias en los océanos [33]. Su importancia industrial radica en que poseen un gran potencial como fuente de carbohidratos, proteínas, lípidos, pigmentos y otros formados a través del proceso fotosintético sobre sustancias inorgánicas simples como dióxido de carbono, compuestos nitrogenados y fosforados [28,37].

Generalmente la biomasa está constituida por 20-40% de lípidos, de 40-50% de proteínas, y la parte restante subdividida entre los carbohidratos, que en algunas especies pueden llegar hasta el 55% de la biomasa y otros compuestos de importancia menor. Sin embargo, para los lípidos se han reportado valores en un rango del 1 al 70%, o incluso superiores [1,17].

#### 1.1.1 Descripción de los géneros de microalgas utilizadas.

**1.1.1.1 *Amphiprora* sp. Ehrenberg, 1843.** 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 (generalmente del 37%). Su pared celular o frústulas de color amarillo oro consta de dos mitades que se superponen y adaptan entre sí, constituyendo las valvas [29].

**1.1.1.2 *Nannochloropsis* sp. D.J. Hibberd, 1981.** Especie de microalga que se desarrolla en ambientes marinos. Las células son pequeñas (2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro), esféricas o ligeramente ovoides, no flageladas. Tienen un único cloroplasto sin pirenoide y que contiene varias bandas de laminillas fotosintéticas, cada una con tres tilacoides por banda. Esta microalga tiene un importante interés aplicado como fuente de ácidos grasos poliinsaturados, puesto que acumula importantes cantidades de ácido eicosapentaenico [10].

**1.1.1.3 *Navicula* sp. Bory de Saint-Vincent, 1822.** 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 [26].

## **1.2 Características del aceite de microalgas.**

Dependiendo de las especies, las microalgas producen diferentes tipos de lípidos, hidrocarburos y otros aceites complejos, de los cuales no todos son adecuados para la producción de biodiesel [3].

La cantidad total de lípidos, así como la tipología de los ácidos grasos presentes, además de ser específica para cada especie, está ligada a factores ambientales como la intensidad luminosa, pH, salinidad, temperatura, concentración de nitrógeno y otros nutrientes en el medio de cultivo [4]. Los lípidos de las microalgas son principalmente ésteres de glicerol formados por ácidos grasos saturados e insaturados con cadenas constituidas de 14-20 átomos de carbono.

## **1.3 Obtención de aceite de microalgas.**

Las etapas clave involucradas en el proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas son el cultivo, cosecha, extracción de lípidos y por último, la transesterificación de estos [19]. Antes de realizar la extracción se considera en algunos casos aplicar mecanismos de ruptura celular debido a que el rendimiento de la extracción depende de la eficiencia de esta [16].

**1.3.1 Disrupción celular.** El principal problema a la hora de realizar la extracción del aceite de las microalgas es el rompimiento de la pared celular, puesto que algunas especies, poseen una matriz celular compleja, otras como las diatomeas, poseen frústulas de hidratos de sílice, las cuales las protegen. Por tanto, la ruptura celular es particularmente compleja, debido a la diferencia que existe a nivel de composición de pared celular entre los diferentes géneros de microalgas [31]. El método de disrupción celular es de gran importancia en la obtención de los productos intracelulares de los microorganismos, y es clave para aumentar la eficiencia en la extracción de lípidos, puesto que al romper la estructura celular, más lípidos almacenados dentro de las células pueden ser liberados favoreciendo el contacto de estos con el solvente orgánico [18,20]. Al someter la biomasa a un método de disrupción celular como la hidrólisis, los componentes hidrosolubles presentes en la pared celular son disueltos por el agente disruptor empleado, este material disuelto se denomina masa solubilizada.

**1.3.2 Extracción.** La extracción de aceite de microalgas a nivel de laboratorio se ha realizado empleando solventes químicos, choque osmótico, extracción con fluidos supercríticos, extracción asistida con ultrasonido, extracción asistida con microondas, hidrólisis y extracción mediante destrucción mecánica [19].

La extracción con solvente químico de lípidos consiste en usar un solvente para extraer selectivamente compuestos de interés presentes en una muestra. Dentro de estos métodos de extracción se encuentran principalmente Soxhlet [36], Bligh & Dyer [7], Etanol-Hexano [30], e In Situ empleando diferentes solventes.

**1.3.2.1 Soxhlet.** Es método estándar de extracción de muestras sólidas. Esta técnica se usa comúnmente en el laboratorio para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza [16]. El sistema se compone de un matraz, una cámara de extracción (tubo Soxhlet), y un condensador [2].

En este método, el solvente situado en el matraz se calienta hasta alcanzar su temperatura de ebullición, los vapores ascienden por un conducto del tubo Soxhlet y pasan a estado líquido en el condensador ubicado en el tope del extractor,

cayendo gota a gota sobre el cartucho que contiene la muestra [34,14]. Cuando el nivel del solvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón, el solvente con los analitos disueltos retorna al matraz [8]. Se recupera el solvente mediante destilación simple [35].

**1.3.2.2 Bligh & Dyer.** Este método principalmente comprende las etapas de agitación, centrifugación, filtración y evaporación, empleando metanol, cloroformo y agua como solventes [23,7]. El metanol es un solvente polar que disuelve los lípidos polares, por otro lado, el cloroformo es un solvente no polar el cual disuelve los lípidos neutros presentes en la extracción y el agua al ser un disolvente polar permite separar la fase metanol/lípidos polares de la fase cloroformo/lípidos neutros [9,15].

**1.3.2.3 Etanol-Hexano.** Este método de extracción consiste fundamentalmente de dos etapas. En la primera etapa, el etanol es usado para extraer los lípidos desde la biomasa. Aunque el etanol es un muy buen solvente también puede extraer algunos contaminantes celulares tales como azúcares, aminoácidos, sales, proteínas y pigmentos, que no son deseables durante la extracción del contenido lipídico [24]. El segundo paso consiste en la formación de un sistema bifásico, mediante la adición de hexano al extracto de aceite crudo obtenido del primer paso. De esta manera muchos de los lípidos son transferidos a la fase hexánica y la mayoría de las impurezas remanentes, permanecen en la fase alcohólica.

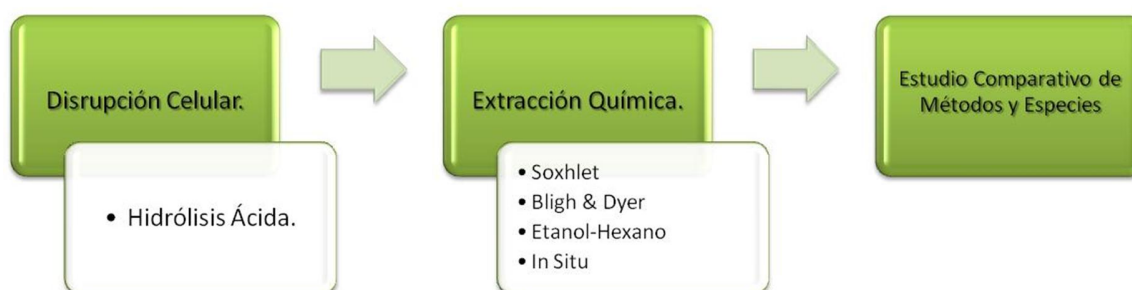
Este es un procedimiento alternativo a los métodos tradicionales para la extracción de lípidos, que usan solventes de alta toxicidad. Además reduce la cantidad total de solvente utilizado [31].

**1.3.2.4 Métodos in situ.** Este tipo de método consiste en la agitación a alta velocidad por un tiempo prolongado de una mezcla solvente-biomasa, la posterior separación de fases y recuperación del extracto lipídico.

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental desarrollada contempla tres etapas: la disrupción celular mediante hidrólisis ácida, la extracción del aceite empleando diferentes métodos (Soxhlet, Bligh & Dyer, Etanol-Hexano e in situ) y la comparación estadística tanto de los métodos como del desempeño de las especies ante los diferentes métodos de extracción (figura 1).

Figura 1: Metodología experimental desarrollada



### 2.1 MATERIALES

**2.1.1 Materia Prima.** Los géneros de microalgas utilizados fueron suministrados por la Corporación Instituto de Morrosquillo (punta Bolívar, Colombia), su cultivo se realizó en estanques abiertos, se cosecharon por floculación, fueron secadas al sol y refrigeradas hasta su utilización; los géneros trabajados son:

- ✓ *Amphiprora* sp.
- ✓ *Nannochloropsis* sp.
- ✓ *Navicula* sp.

### 2.2 Reactivos y equipos

**2.2.1 Reactivos.** Para la etapa de disrupción celular el reactivo utilizado fue ácido clorhídrico. Mientras que para los métodos de extracción se usaron hexano, ciclohexano, etanol, metanol, cloroformo como solventes, conjuntamente durante el desarrollo de algunos métodos se empleó agua destilada en la preparación de las soluciones y en los procesos de lavado, las propiedades principales se muestran en el anexo A.

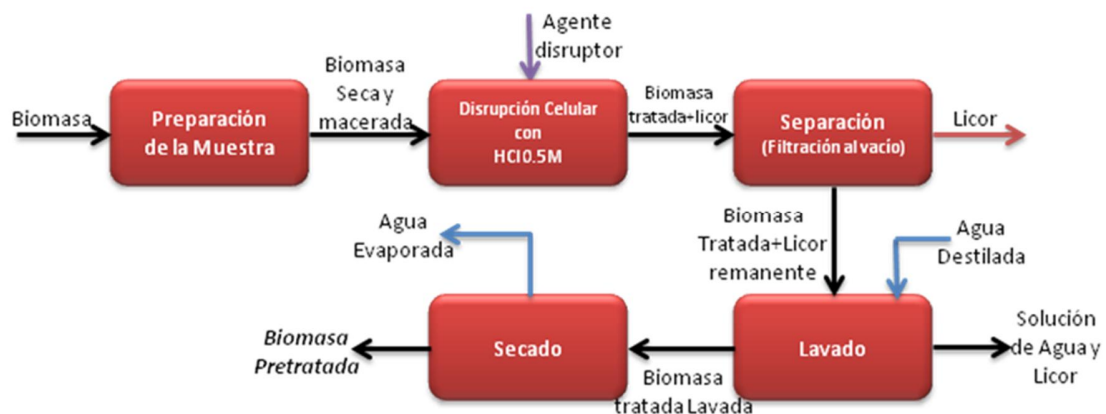
**2.2.2 Equipos.** Los principales equipos utilizados durante la experimentación, se especifican en el Anexo B.

- a) Balanza analítica.
- b) Plancha de calentamiento con agitación.
- c) Equipo de filtración al vacío.
- d) Manta de calentamiento.
- e) Centrifugadora.
- f) Horno digital de convección.
- g) Homogenizador SilentCrusher M.

## 2.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

**2.3.1 Disrupción Celular.** En este trabajo se empleó la hidrólisis acida mostrada en la figura 2 como método de disrupción celular.

**Figura 2:** Diagrama de bloques método de disrupción celular.



La hidrólisis ácida comienza con el secado de la biomasa de microalgas a 105°C durante 4 horas y la maceración que sirve para la disminución de partículas y homogenización de la biomasa; luego se agita la biomasa durante 30 minutos a 500 rpm en una solución de ácido clorhídrico (HCl) [0,5 M]. Posteriormente se separa la biomasa tratada de la fase líquida empleando filtración al vacío, la fase sólida retenida en el filtro se lava con abundante agua destilada con el fin de eliminar residuos del agente disruptor, por último, la biomasa se seca nuevamente de la misma manera, el procedimiento se puede observar en el anexo C.

### 2.3.2 Métodos de Extracción empleados.

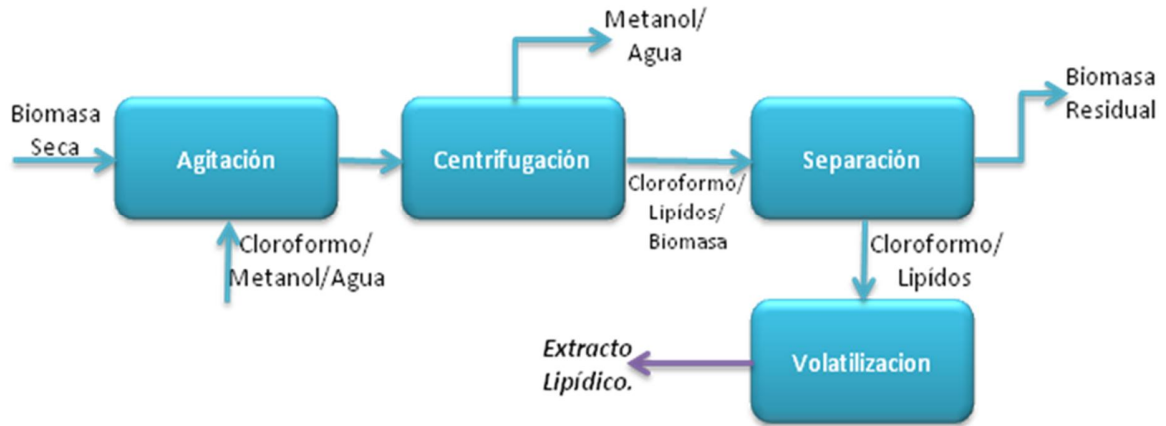
**2.3.2.1 Soxhlet.** Esta extracción se realizó con las condiciones establecidas en la metodología experimental y siguiendo las condiciones de operación mostradas en el anexo D. El proceso se ilustra en la figura 3.

**Figura 3:** Diagrama de bloques Soxhlet



**2.3.2.2 Bligh & Dyer modificado.** Esta extracción se realizó con las condiciones establecidas en la metodología experimental y siguiendo las condiciones de operación mostradas en el anexo E. El proceso se ilustra en la figura 4. Teniendo en cuenta que para este método no se realiza disruptión celular antes de la extracción. Esto fue resultado de estudios anteriores [13].

Figura 4: Diagrama de bloques Bligh and Dyer



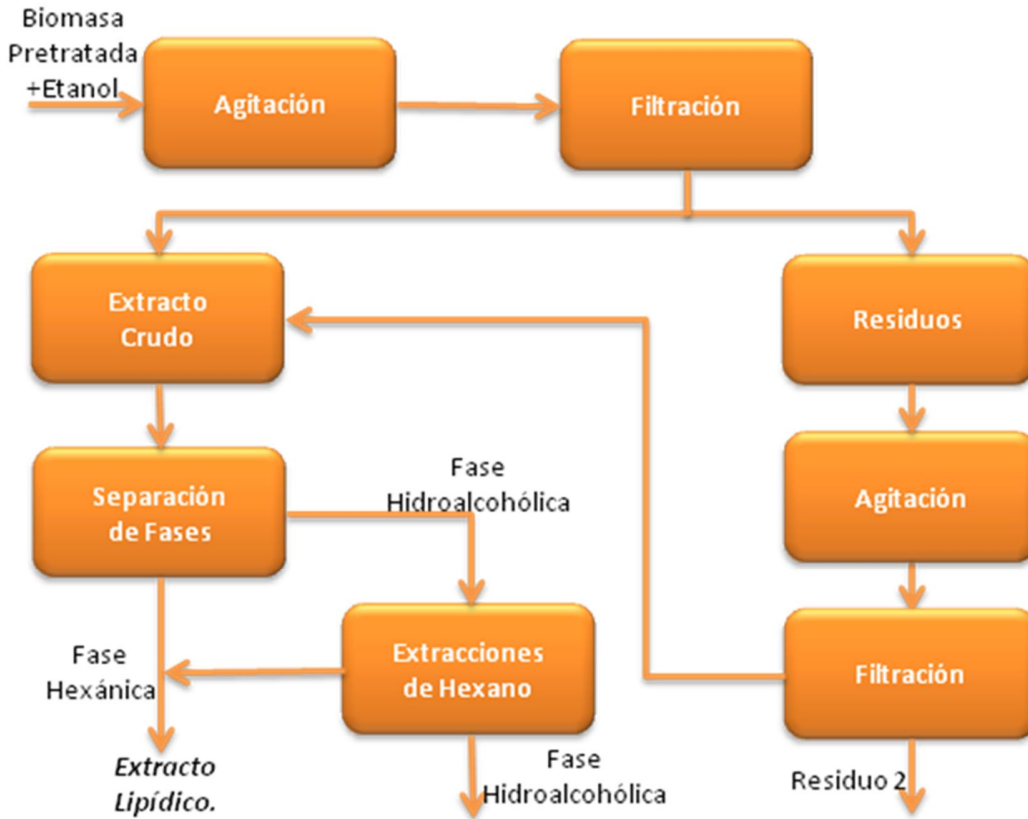
**2.3.2.3 Extracción In Situ.** Esta extracción se realizó con las condiciones establecidas en la metodología experimental y siguiendo las condiciones de operación mostradas en el anexo F. El proceso se ilustra en la figura 5.

Figura 5: Diagrama de bloques In Situ



**2.3.2.4 Extracción con Etanol-Hexano.** Esta extracción se realizó con las condiciones establecidas en la metodología experimental y siguiendo las condiciones de operación mostradas en el anexo G [5]. El proceso se ilustra en la figura 6.

Figura 6: Diagrama de bloques Etanol-Hexano



**2.3.3 Cuantificación del extracto.** La cuantificación del extracto lipídico se realiza por medio de las siguientes ecuaciones:

$$W_{Real} = \frac{W_{Bio.Pre}}{\%Recup_{Bio}} \cdot 100\% \quad (Ec 1)$$

Donde  $W_{Bio.Pre}$  es el peso de la biomasa pretratada (g),  $\%Recup_{Bio}$  el porcentaje de recuperación en el proceso de pretratamiento de la biomasa,  $W_{Real}$  el peso real adicionado a la muestra (g).

$$\%Ext_{lip} = \frac{W_{Lip}}{W_{real}} \cdot 100\% \quad (Ec 2)$$

Donde  $W_{Lip}$  es el peso del extracto lipídico (g),  $\%Ext_{lip}$  es el porcentaje de extracto lipídico.

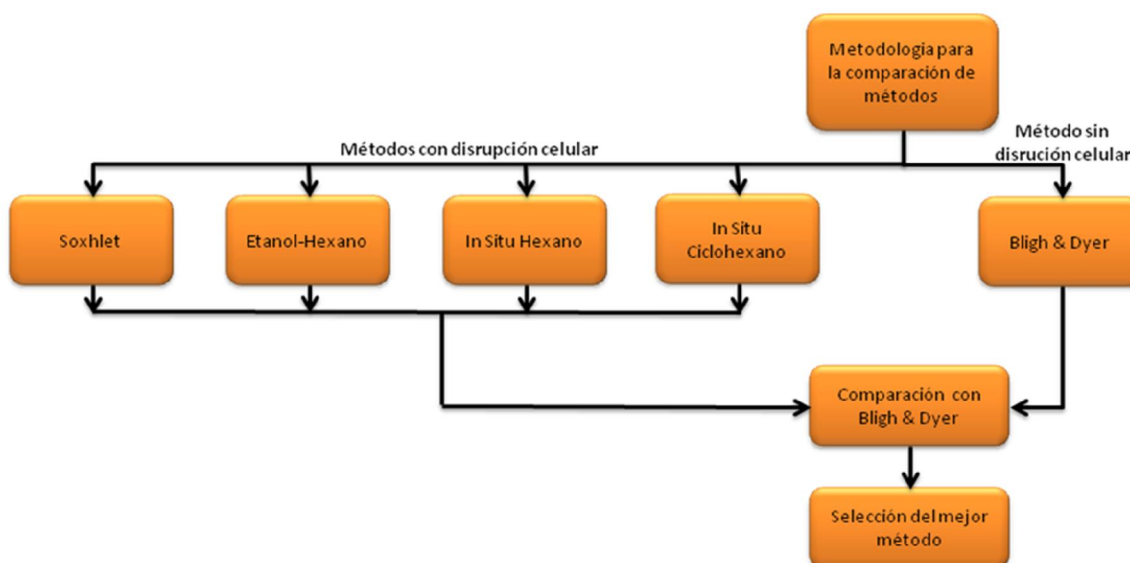
$$Eficiencia = \frac{\%Ext_{Lip}}{\%Lip_{ICP}} * 100 \quad (Ec 3)$$

Donde  $\%Lip_{ICP}$  es el porcentaje lípidos contenidos en cada especie suministrado por el ICP.

## 2.4 Estudio estadístico

Este estudio se realiza con el software STATGRAPHICS Centurion XV, utilizando la herramienta “comparación de varias muestras” la cual realiza las pruebas de múltiples rangos y estudio de medias, para estas pruebas se toman los datos de extracto lipídico por cada método y genero de microalga. Estas pruebas indican si hay o no diferencias significativas entre cada uno de los métodos, esto se ve en la tabla de rangos múltiples cuando al lado del par de métodos no hay un ‘\*’, un criterio a tener en cuenta es el valor-P, cuando P es menor 0.05 hay diferencias significativas y si P es mayor de 0.05 no hay diferencias significativas.

**Figura 7:** Metodología para la comparación de métodos.



### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

La tabla 1 muestra la composición fisicoquímica y el orden de los diferentes géneros de microalgas utilizadas en este trabajo de investigación. De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede afirmar que los tres géneros seleccionados en este estudio tienen un bajo porcentaje de lípidos, proteínas, carbohidratos y nitrógeno esto se debe a la gran cantidad de cenizas presentes en la biomasa, las cuales corresponden al floculante utilizado para su cosecha, y el cual no hace parte originalmente de la biomasa cultivada, si se elimina de la base de cálculo el floculante, es claro que estos porcentajes se incrementan significativamente.

**Tabla 1.** Caracterización taxonómica y fisicoquímica de los géneros estudiados

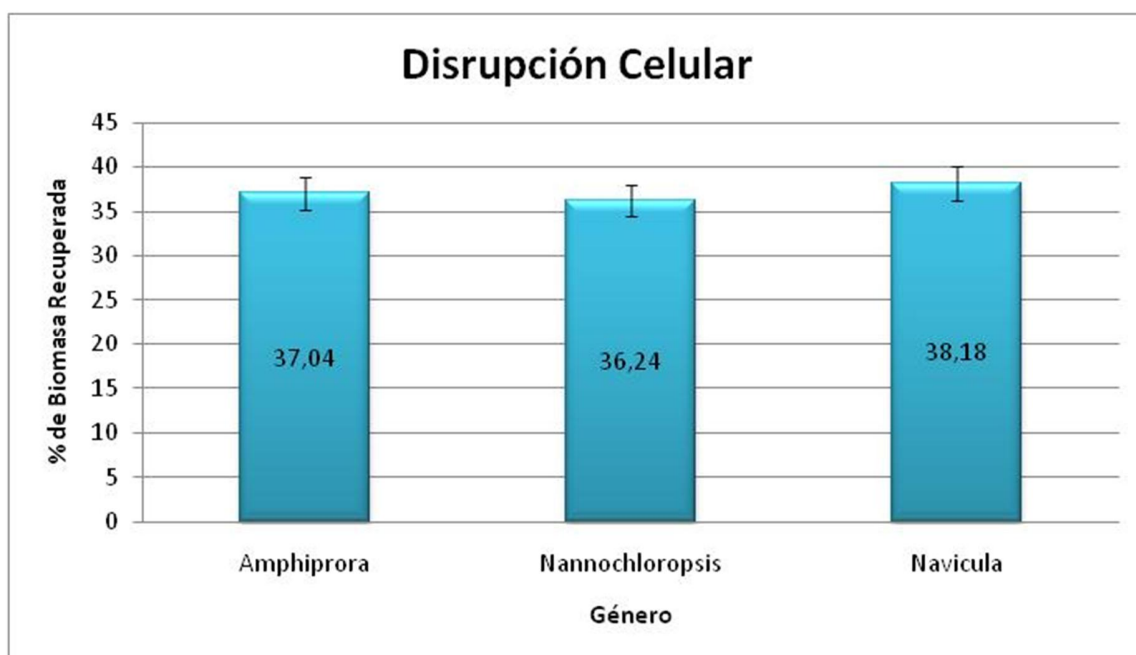
Genero	Orden	Lípidos, %	Nitrógeno, %	Proteínas, %	Cenizas, %	Carbohidratos, %
<i>Amphiprora</i> sp.	Naviculales	11.3	3.4	21.3	57.9	6.2
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Eustigmatales	12	2.1	13.2	53	3.3
<i>Navicula</i> sp.	Naviculales	13.2	3.2	15.1	51.6	5.2

Fuente: ICP y Autores

#### 3.1 Rendimiento de la disrupción celular.

En la figura 8 se aprecia el porcentaje de biomasa obtenido después de aplicar la disrupción celular mediante hidrólisis ácida. Los porcentajes de biomasa aprovechada para la extracción de lípidos se encuentran en un intervalo de 30-40% con respecto a la biomasa total. Esto se debe a la alta concentración de cenizas en la biomasa, y a que en la hidrólisis los azúcares y el material celulósico de las microalgas son degradados formando parte del material hidrosoluble llamado licor, lo cual significa que la biomasa obtenida después de la hidrólisis es rica en lípidos y otros componentes no hidrosolubles.

**Figura 8:** Rendimiento de hidrolisis acida.

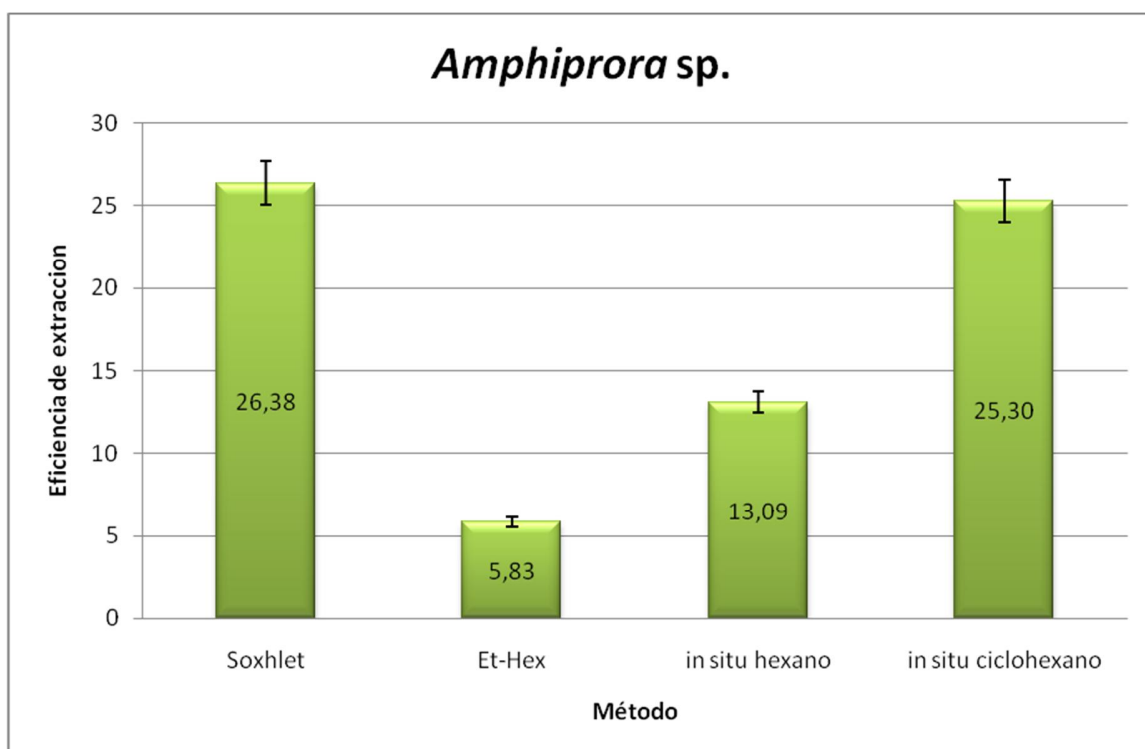


También se aprecia que los porcentajes de biomasa hidrolizada presentan un comportamiento estable para cada uno de los géneros estudiados. Por lo anterior, se puede afirmar que el pre-tratamiento con ácido es un método adecuado para ser aplicado a microalgas de distinto orden taxonómico.

### **3.2 Rendimiento del proceso de extracción de lípidos a partir de biomasa hidrolizada**

La cantidad de extracto lipídico obtenido cambia según el método de extracción aplicado y el género de microalga al que se aplica. En las figuras 9,11 y 13 se presentan los métodos aplicados por cada género y su eficiencia.

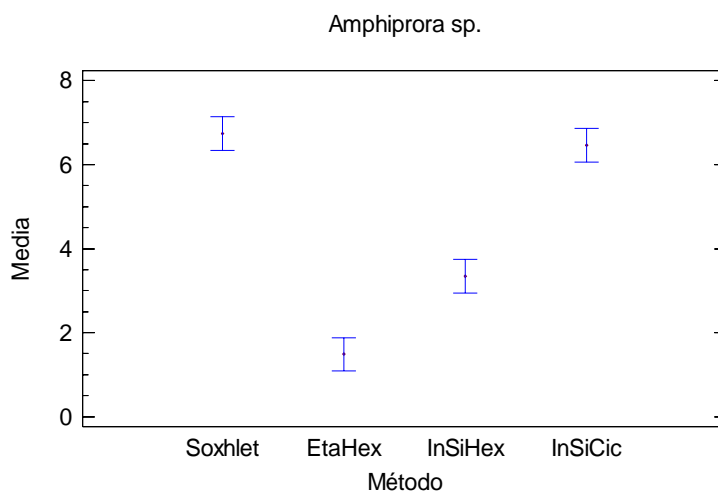
**Figura 9:** Eficiencia de extracción para el género *Amphiprora* sp.



La comparación de métodos, para *Amphiprora* sp., muestra que el método Soxhlet es el de mayor eficiencia y es uno de los más selectivos garantizando la calidad del extracto seguido por el método in situ ciclohexano el cual debido al solvente asegura que el extracto lipídico sea rico en lípidos neutros.

En la figura 10 se presenta la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis estadístico, de los resultados obtenidos para el porcentaje de extracto lipídico. Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 4 muestras con un Intervalo de Confianza de 95% y un *valor P* = 0.0001.

**Figura 10:** Gráfico de Medias para el género *Amphiprora* sp.



En la tabla 2 se observan las diferencias significativas entre grupos.

**Tabla 2.** Prueba de Múltiples Rangos para el género *Amphiprora* sp.

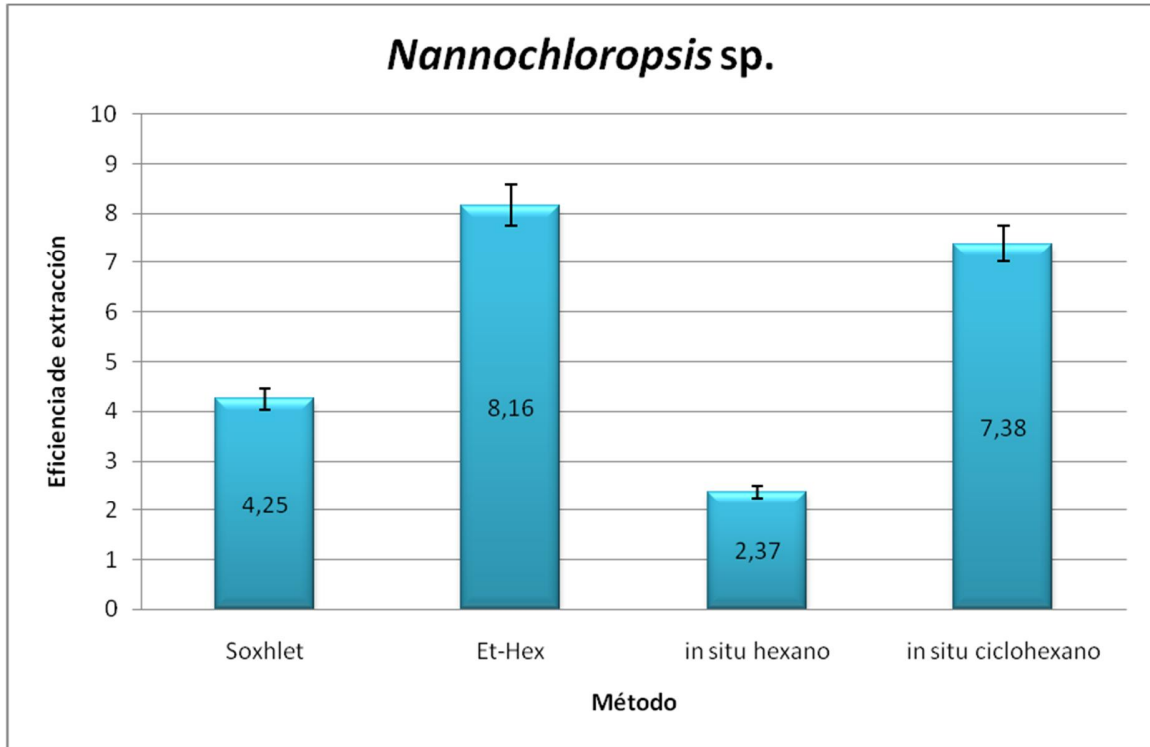
Contraste	Significancia	Diferencia
Soxhlet-Etanol Hexano	*	5.2498
Soxhlet-In Situ Hexano	*	3.3946
Soxhlet-In Situ Ciclohexano		0.277
Etanol Hexano-In Situ Hexano	*	-1.8552
Etanol Hexano- In Situ Ciclohexano	*	-4.9728
In Situ Hexano- In Situ Ciclohexano	*	-3.1176

\* indica una diferencia significativa.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 2 se evidencia que no existen diferencias significativas entre los métodos Soxhlet e In Situ Ciclohexano.

Este resultado es favorable para la toma de decisiones en la transferencia tecnológica del proceso de producción de biodiesel, debido a que teniendo en cuenta los aspectos ambientales, energéticos y económicos es mejor utilizar el método in situ ciclohexano para biomasa del género *Amphiprora* sp.

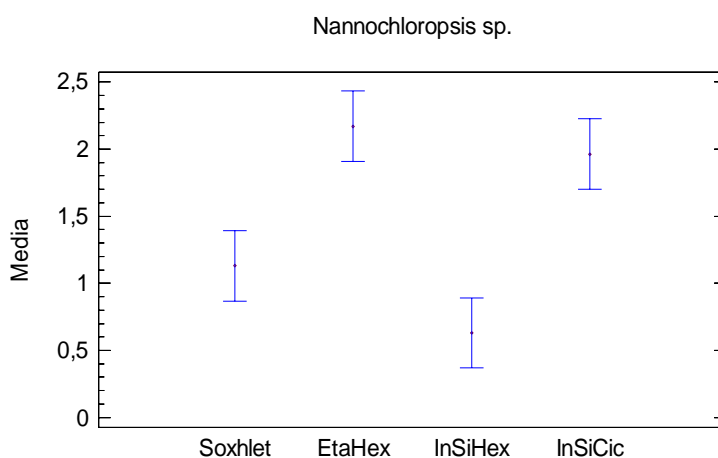
Figura 11: Eficiencia para el género *Nannochloropsis* sp.



La comparación de métodos para *Nannochloropsis* sp., muestra que el método de mayor eficiencia de extracción es el Etanol-Hexano, debido a la adición de hexano, el cual atrapa los lípidos disueltos en la fase alcohólica garantizando que el extracto sea en gran parte lípidos, seguido de in situ ciclohexano. Esta microalga es la de más difícil manipulación ya que al aplicar el método in situ ocurría un fenómeno de sedimentación debido a su fisiología, ocasionando que el solvente no actuó eficientemente.

En la figura 12 se presenta la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis estadístico de los resultados obtenidos para el porcentaje de extracto lipídico. Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 4 muestras con un Intervalo de Confianza de 95% y un valor  $P = 0.0036$ .

**Figura 12:** Gráfico de Medias para el género *Nannochloropsis* sp.



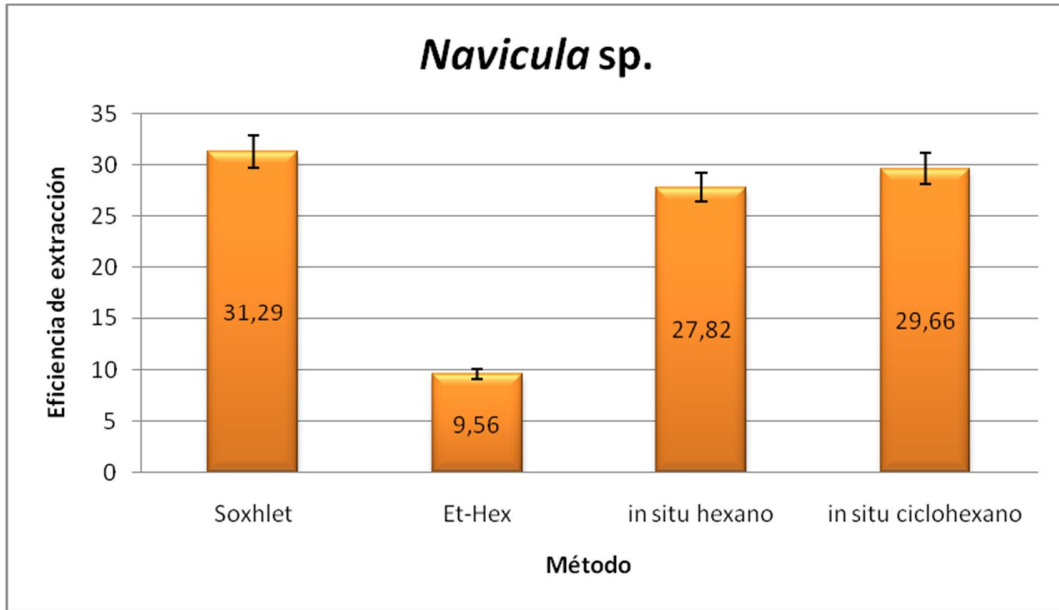
En la tabla 3 se observan las diferencias significativas entre grupos.

**Tabla 3.** Prueba de Múltiples Rangos para el género *Nannochloropsis* sp.

Contraste	Significancia	Diferencia
Soxhlet-Etanol Hexano	*	-1.0399
Soxhlet-In Situ Hexano		0.4999
Soxhlet-In Situ Ciclohexano	*	-0.8326
Etanol Hexano-In Situ Hexano	*	1.5398
Etanol Hexano- In Situ Ciclohexano		0.2073
In Situ Hexano- In Situ Ciclohexano	*	-1.3325

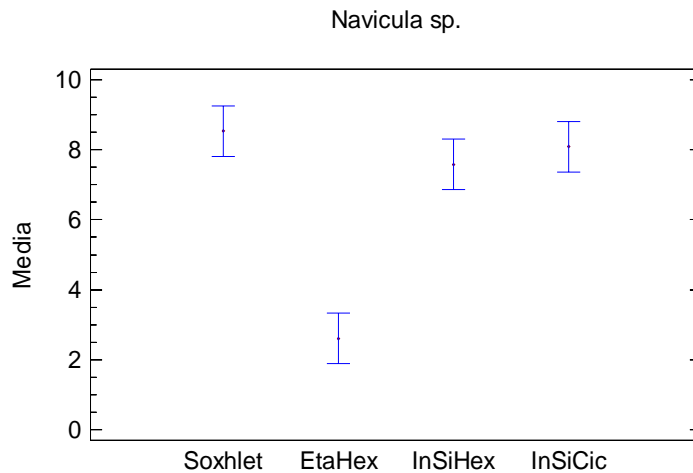
De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 3 se evidencia que no existen diferencias significativas entre los métodos Etanol-Hexano e In Situ Ciclohexano. Este resultado es favorable para la toma de decisiones en la transferencia tecnológica del proceso de producción de biodiesel, debido a que teniendo en cuenta los aspectos ambientales, energéticos y económicos es mejor utilizar el método in situ ciclohexano, a su vez no se registra diferencia significativa entre los métodos de extracción Soxhlet e in Situ hexano los cuales se descartan por su bajo porcentaje de extracción.

**Figura 13:** Eficiencia para el género *Navicula* sp.



La comparación de métodos, para *Navicula* sp., muestra que el método Soxhlet es el de mayor eficiencia seguido por el método In Situ Ciclohexano e In Situ Hexano. En la figura 14 se presenta la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis estadístico de los resultados obtenidos para el porcentaje de extracto lipídico. Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 4 muestras con un Intervalo de Confianza de 95% y un valor  $P = 0.0010$ .

**Figura 14:** Gráfico de Medias para el género *Navicula* sp.



En la tabla 4 se observan las diferencias significativas entre grupos.

**Tabla 4.** Prueba de Múltiples Rangos para el género *Navicula* sp.

Contraste	Significancia	Diferencia
Soxhlet-Etanol Hexano	*	5.9277
Soxhlet-In Situ Hexano		0.6485
Soxhlet-In Situ Ciclohexano		0.4461
Etanol Hexano-In Situ Hexano	*	-4.9792
Etanol Hexano- In Situ Ciclohexano	*	-5.4817
In Situ Hexano- In Situ Ciclohexano		-0.5024

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 4 se evidencia que no existen diferencias significativas entre los métodos Soxhlet, In Situ hexano e In Situ Ciclohexano.

Este resultado es favorable para la toma de decisiones en la transferencia tecnológica del proceso de producción de biodiesel, debido a que teniendo en cuenta los aspectos ambientales, energéticos y económicos es mejor utilizar el método In Situ Ciclohexano, a su vez hay una diferencia significativa del grupo anterior con el método Etanol-Hexano lo cual deja ver que es un método poco eficiente para la producción de biodiesel a partir del género *Navicula* sp.

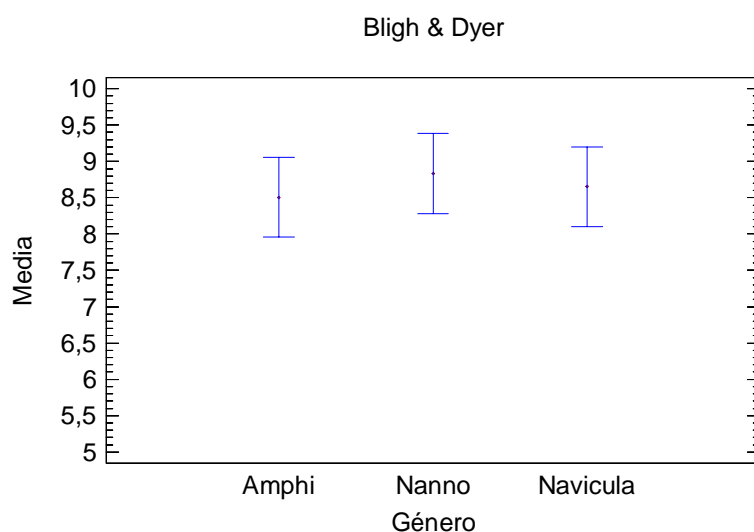
La comparación de las especies con los resultados muestra que el método Soxhlet sobresale en dos de las tres especies, el método que obtiene resultados similares al método Soxhlet es el In situ Ciclohexano que obtiene porcentajes altos de extracto lipídico comparados con los demás métodos en todas las especies aplicadas. En general el método que logra el más alto porcentaje de extracto lipídico es el método Soxhlet seguido por in situ ciclohexano.

### **3.3 Comparación del método Bligh & Dyer modificado.**

La comparación de géneros de microalgas, muestra que no hay diferencias significativas entre *Amphiprora* sp., *Nannochloropsis* sp., y *Navicula* sp. En la

figura 15 se presenta la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis estadístico de los resultados obtenidos para el porcentaje de extracto lipídico. Se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 3 muestras con un Intervalo de Confianza de 95% y un *valor P* = 0.6769.

**Figura 15:** Gráfico de Medias para el método Bligh & Dyer.



En la tabla 5 se observan las diferencias significativas entre grupos

**Tabla 5.** Prueba de Múltiples Rangos para el método Bligh & Dyer

Contraste	Significancia	Diferencia
Amphiprora - Nannochloropsis		-0.3263
Amphiprora - Navicula		-0.1456
Nannochloropsis - Navicula		0.1808

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 5 se evidencia que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de extracción para los géneros de microalgas analizados.

### 3.4 Comparación de los métodos Soxhlet e In Situ Ciclohexano con Bligh & Dyer modificado.

El método Bligh & Dyer es el que muestra mayor eficiencia de extracto lipídico para los tres géneros de microalgas, aproximadamente dos veces la cantidad que el método Soxhlet, el método Bligh & Dyer es el único al cual no es necesario hacerle disrupción celular, lo cual fue establecido en trabajos anteriores [37]. La figura muestra estos resultados.

Rendimientos del método Bligh & Dyer, Soxhlet e in situ Ciclohexano

**Tabla 6.** Extracto Lipídico del método por género.

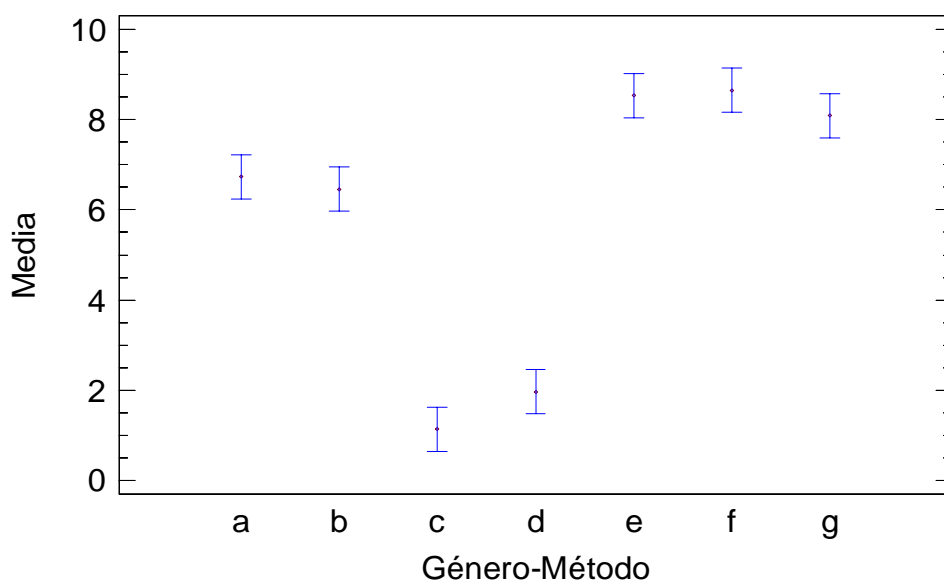
Genero/ Método de Extracción	Soxhlet	Bligh & Dyer Modificado	In Situ Ciclohexano
<i>Amphiprora</i> sp.	6.7379 ± 0,1453	8,5065 ± 0,3127	6,46095 ± 0,2756
<i>Nannochloropsis</i> sp.	1,13 ± 0,0385	8,8328 ± 0,1510	1,9626 ± 0,2233
<i>Navicula</i> sp.	8,5349 ± 0,8588	8,6520 ± 0,4889	8,0889 ± 0,2823

A continuación en la figura 16 se hace el estudio estadístico comparando los tres métodos. Debido a que no existen diferencias significativas entre los géneros de microalgas para el método Bligh & Dyer se hizo el estudio estadístico con la especie *Nannochloropsis*.

La comparación de métodos para los géneros estudiados, muestra que el método Bligh & Dyer es el de mayor eficiencia, seguido por los métodos Soxhlet e In Situ Ciclohexano.

En la figura 16 se presenta la distribución de los valores de medias y medianas utilizados para el análisis estadístico de los resultados obtenidos para el porcentaje de extracto lipídico. Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 7 muestras con un intervalo de confianza de 95% y un valor  $P = 0.0000$ .

**Figura 16:** Gráfico de Medias para los métodos Soxhlet, B&D e In Situ Ciclohexano.



- a) *Amphiprora* sp.-Soxhlet
- b) *Amphiprora* sp.-In Situ Ciclohexano
- c) *Nannochloropsis* sp.-Soxhlet
- d) *Nannochloropsis* sp.-In Situ Ciclohexano
- e) *Navicula* sp.-Soxhlet
- f) *Navicula* sp.-Bligh & Dyer
- g) *Navicula* sp.-In Situ Ciclohexano

**Tabla 7.** Prueba de Múltiples Rangos para los métodos Soxhlet, B&D e In Situ Ciclohexano.

Contraste	Significancia	Diferencia
Amphiprora Soxhlet - Amphiprora In Situ Ciclohexano		0,277
Amphiprora Soxhlet – Nannochloropsis Soxhlet	*	5,60795
Amphiprora Soxhlet – Nannochloropsis Bligh & Dyer	*	4,77535
Amphiprora Soxhlet – Navicula Soxhlet	*	-1,797
Amphiprora Soxhlet – Navicula Bligh & Dyer	*	-1,9141
Amphiprora Soxhlet – Navicula In Situ Ciclohexano	*	-1,35095
Amphiprora In Situ Ciclohexano – Nannochloropsis Soxhlet	*	5,33095

Amphiprora In Situ Ciclohexano – Nannochloropsis In Situ Ciclohexano	*	4,49835
Amphiprora In Situ Ciclohexano – Navicula Soxhlet	*	-2,074
Amphiprora In Situ Ciclohexano – Navicula Bligh & Dyer	*	-2,1911
Amphiprora In Situ Ciclohexano – Navicula In Situ Ciclohexano	*	-1,62795
Nannochloropsis Soxhlet – Nannochloropsis In Situ Ciclohexano		-0,8326
Nannochloropsis Soxhlet – Navicula Soxhlet	*	-7,40495
Nannochloropsis Soxhlet – Navicula Bligh & Dyer	*	-7,52205
Nannochloropsis Soxhlet – Navicula In Situ Ciclohexano	*	-6,9589
Nannochloropsis In Situ Ciclohexano – Navicula Soxhlet	*	-6,57235
Nannochloropsis In Situ Ciclohexano – Navicula Bligh & Dyer	*	-6,68945
Nannochloropsis In Situ Ciclohexano – Navicula In Situ Ciclohexano	*	-6,1263
Navicula Soxhlet – Navicula Bligh & Dyer		-0,1171
Navicula Soxhlet – Navicula In Situ Ciclohexano		0,44605
Navicula Bligh & Dyer – Navicula In Situ Ciclohexano		0,56315

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 7 se evidencia que no existen diferencias significativas para el género *Navicula* entre Bligh & Dyer, Soxhlet e In Situ Ciclohexano, esto brinda la ventaja de utilizar otros criterios de selección para la aplicación de un método de extracción a escala de laboratorio, tales como impacto ambiental, requerimientos energéticos, selectividad de los solventes o factibilidad técnico-económica.

#### 4. CONCLUSIONES

- A pesar de que los tres géneros de microalgas eran distintos y de dos órdenes diferentes los porcentajes de biomasa después de la hidrólisis fueron similares (30-40%) lo que confirma la aplicabilidad del método de disrupción celular utilizado a microalgas de distinto orden taxonómico.
- No hay diferencia significativa entre aplicación en laboratorio de Soxhlet e In Situ Ciclohexano para genero *Amphiprora sp.*, la decisión final sobre el método a aplicar debe ser tomado después del estudio de escalamiento.
- Los métodos más eficientes (con mayor porcentaje de extracción) son el etanol-hexano e in situ ciclohexano para el género *Nannochloropsis sp.* además estadísticamente no hay diferencias significativas entre ambos métodos.
- No existen diferencias significativas para el género *Navicula* entre Bligh & Dyer, Soxhlet y In Situ Ciclohexano, esto brinda la ventaja de utilizar otros criterios de selección para escalamiento de un método de extracción para este género, tales como impacto ambiental, requerimientos energéticos, selectividad de los solventes o factibilidad técnico-económica.
- A escala laboratorio los métodos más eficientes para todos los géneros fueron Soxhlet e In Situ Ciclohexano, además estos no tienen diferencia significativa lo cual obliga aplicar criterios como, requerimientos energéticos, selectividad de los solventes o factibilidad técnico-económica para la toma decisión sobre la utilización de uno u otro método.

## 5. RECOMENDACIONES

- Aplicar y validar la metodología propuesta en este trabajo a otras especies de microalgas nativas de otros órdenes, géneros y características fisiológicas.
- Aplicar técnicas adicionales de caracterización a los extractos lipídicos con el fin de identificar los componentes del extracto.
- Realizar un análisis energético y exergético, análisis ciclo de vida y un estudio de factibilidad técnico-económica para evaluar si los proceso de extracción son viables a escala industrial.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALBARRACÍN, Isabel. Microalgas: potenciales productoras de biodiesel. XV simposio electrónico internacional la producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad, Argentina 2007. 16p.
2. ALVA, Marco. Determinación del contenido graso de leche en polvo: extracción Soxhlet. En: Guía de Prácticas de Bromatología. 2da. Edición. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Perú: Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, 2010. p. 23-27
3. ALVAREZ COBELAS, M.; ZARCO LECHADO, J. 1989. Lipids in Microalgae. A review I. Biochemistry. Grasas y Aceites. Vol.40, fasc. 2: 118-145.
4. ALVAREZ COBELAS, M. 1989. Lipids in Microalgae. A review II. Environment. Grasas y Aceites. Vol.40, fasc. 3: 213-223.
5. AMAYA, Andrés y SARMIENTO, Ronald. Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas con etanol-hexano empleando disrupción celular térmica y química. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química, 2010. 32p.
6. BENEMANN, J.R.; Weissman, J.C.; Goebel, R.P.; Augenstein, D.C. 1986. Microalgae fuel economics. In Algal Biomass Technologies. Barclay and McIntosh (Eds). Nova hedwigia Beih, 83, J. Cramer. Berlín. p. 176-191.
7. BLIGH, EG. y DYER, WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal Biochemistry Physiology, 1959, vol. 37 N° 8, p. 911-917.

8. BLUM-FRETZ, Claudia; BAUMANN, Andreas, y FEIFEL, Susanne. Fat determination: comparison between Soxhlet and Hot Extraction. BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland, 2007, 47:1-8.
9. CHRISTIE, W.W. Preparation of lipid extracts from tissues. En: Advances in Lipid Methodology. Vol. 2. 1993, p. 195-213.
10. COHEN Z. Products from microalgae. *In*: Handbook of microalgal mass culture. Richmond A (ed.) 1986: 421-454.
11. FLORES P, Luz y LOPEZ V, José. Las microalgas, fuente de aceite para la producción de Biodiesel.
12. GALINDO, Leislly y GONZÁLEZ, Silvia. Adaptación del método Bligh & Dyer a la extracción de lípidos de microalgas nativas para la producción de biodiesel. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química, 2010. 66p.
13. GALINDO. L, GONZÁLEZ. S, GONZÁLEZ. A, KAFAROV. V. Adaptación del método Bligh & Dyer a la extracción de lípidos de microalgas nativas para la producción de biodiesel. En memorias del XXIX Congreso Latinoamericano de Química. Cartagena, Colombia, septiembre 27 a Octubre 01, 2010, pág. 103.
14. GARCÍA Alberto; GARCÍA, Miguel A; *et al.* Recuperación de cera de cutícula de caña de azúcar mediante separación mecánica y extracción con solventes. Grasas y Aceites, 2003, vol. 54 N°2, p. 169-174.

15. GARCÍA R., J. A. y DÍAZ, IRTA. Nuevas tendencias en el análisis de ácidos grasos. Centro de Tecnología de la Carne. Unidad de Química Alimentaria. Granja Camps i Armet. 17121.
16. GONZÁLEZ, Ángel D., KAFAROV, Viatcheslav, GUZMÁN M., Alexander. 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.
17. HERNÁNDEZ, Efraín; MARTÍNEZ, Alfredo de Jesús y CAÑIZARES Rosa. Contenido de lípidos de dos especies diferentes del género *Scenedesmus* para la eventual producción de bioenergéticos. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, junio, 2009, Acapulco, México.
18. HENRIQUES, M; SILVA, A y ROCHA, J. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 2007, 2: 586-593.
19. LEE, Jae-Yon et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. En: Bioresource Technology. 2009. p. 1-3.
20. LEE, Jae-Yon; YOO, Chan; JUN, So-Young; *et al.* Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Bioresource Technology, 2020, vol. 101 N°1, Supplement 1, p. S75-S77.
21. LUQUE DE CASTRO, M y PRIEGO, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. Journal of Chromatography A, 2010, vol. 1217 N°16, p. 2383–2389.
22. MAJER, Stefan, MUELLER-LANGER Franziska, ZELLER, Vanessa, KALTSCHMITT, Martin. Implications of biodiesel production and utilization on

- global climate - a literature review. En: European Journal of Lipid Science Technology. 2009, Vol. 111, p. 747-762.
23. MANIRAKIZA, P., COVACI, A. and SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using soxhlet, Roese- Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods. En: Journal of Food Composition and Analysis. 2001 Vol. 14, p. 93-100
24. MATA T, MARTINS A, CAETANO N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2010; 14: 217–232.
25. MOLINA, E.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G.; GARCÍA CAMACHO, F.; CAMACHO RUBIO, F.; CHISTI, Y. 2000. Scale up of tubular photobioreactors. Journal of applied Phycology. 12: 355-368
26. Microorganisms Atlas. Algae. Disponible en:  
[http://personal.telefonica.terra.es/web/ayma/atlas\\_m.htm](http://personal.telefonica.terra.es/web/ayma/atlas_m.htm)
27. OCAMPO, Rogelio; RÍOS, Luz; *et al.* Curso práctico de química orgánica. Primera edición. Editorial Universidad de Caldas, 2008. p. 61-64
28. OLVERA-RAMÍREZ, R.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; RÍOS-LEAL, E. 2000. Extracción de pigmentos naturales a partir de microalgas y cianobacterias y su posible aplicación industrial. Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
29. PRIETO, Martha; MOGOLLON, Martha; ADA, Castro; *et al.* Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. Revista MVZ Córdoba [en línea], 2005, vol. 10 N°001, p. 544- 554. [Fecha de consulta: 19 de junio de 2010].

30. RAMÍREZ-FAJARDO, Antonio; CERDÁN, Luis; ROBLES-MEDINA, Alfonso; *et al.* Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2007, vol. 109 N°2, p.120-126.
31. RICHMOND A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology 2004: 7-17.
32. RICHMOND, Amos. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Wiley-Blackwell Publishing, 2004. p. 230-235.
33. SCHNEIDER, J. C. ; ROESSLER, P. 1994. Radiolabelling studies of lipids and fatty acids in *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), oleaginous marine algae. J.Phycol. 30: 594-598
34. SKOOG, Douglas y WEST, Donald. Introducción al análisis gravimétrico. En: Introducción a la química analítica. Cuarta edición. Sevilla: Editorial Reverté S.A, 2002. p. 67- 73.
35. SOGORB, Miguel y VILLAVONA, Eugenio. Extracción Soxhlet. En: Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias. España: Ediciones Díaz de Santos S.A, 2004. p. 20-22
36. SOXHLET, Franz. Die Gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes, Dinglers Polytechnisches Journal, 1879, vol. 232, p 461-465.
37. TRAVIESO, L.; BENITEZ ECHEGOYEN, F. 1998. Cultivo de *Arthrospira* sp.: del Laboratorio a Planta Piloto. Curso: Tecnología y aprovechamiento del cultivo heterotrófico de microalgas. Centro de Investigaciones Pesqueras. La Habana. Cuba.

38.VIEIRA COSTA; J. A. Producción de biodiesel a partir de microalgas. 1er Congreso Latinoamericano sobre Biotecnología Algal. Argentina 2004. ISBN N° 987- 1130-32-5.

## ANEXOS

### ANEXO A: FICHA TÉCNICA DE LOS REACTIVOS.

	Hexano	Alcohol Etilico	Ciclohexano	Cloroformo	Acido Clorhidrico	Metanol
Formula Química	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	CHCl <sub>3</sub>	HCl	CH <sub>3</sub> OH
Masa Molecular	86,2	46,1	84,2	119,39	36,5	32
Pureza (% p/v)	98,5	99,9	99	97,2	37	99,9
Gravedad Especifica (Agua=1) a 20° C	0,66	0,793	0,78	1,484	1,19	0,79
Punto de Ebullición (°C) a 1 atm	69	78,3	81	61	48	64,5
Punto de Fusión (°C)	-94,3	-114,5	6	-63,5	-26	98
Presión de Vapor (hPa) a 20° C	160	59	103	19,58	190	128
Punto de Inflamación (°C)	-22	12	-18	-----	-----	11

**Tabla 8.** Reactivos químicos empleados en el desarrollo experimental.

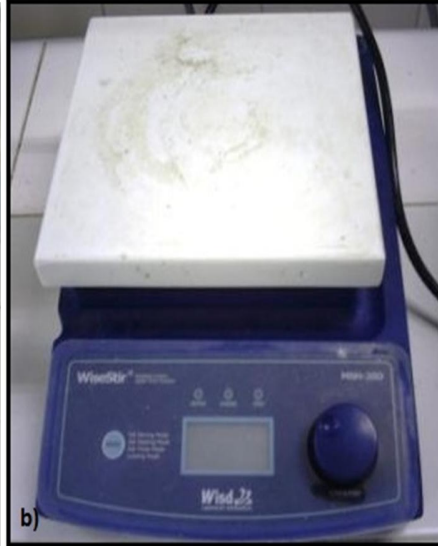
La información suministra en la tabla 8 se obtuvo del catálogo de reactivos y productos 2008-2010 de Merck.

## ANEXO B: PRINCIPALES EQUIPOS EMPLEADOS.



a)

a) Balanza analítica



b)

b) Plancha de calentamiento con agitación



c)

c) Equipo de filtración al vacío



d)

d) Manta de calentamiento



e)

e) Centrífuga



f)

f) Horno digital de convección



g)

g) SilentCrusher M

## **ANEXO C: PRETRATAMIENTO HIDRÓLISIS ACIDA.**

### **Materiales y reactivos:**

- Plancha de agitación.
- Equipo de filtración al vacío.
- Horno digital de convección.
- Mortero.
- Balanza analítica.
- Ácido Clorhídrico (HCl).
- Cámara de extracción de vapores.

### **PROCEDIMIENTO DEL DISRUPCIÓN CELULAR**

1. Pesar la biomasa a pre tratar.
2. Macerar la biomasa.
3. Agregar HCl 0.5M.
4. Agitar a 500 rpm durante 30 min.
5. Filtrar al vacío realizando lavados de 400 ml de agua destilada por cada 100 ml de solución.
6. Secar a 105° C durante 4 horas.



a)

a) Agitación.



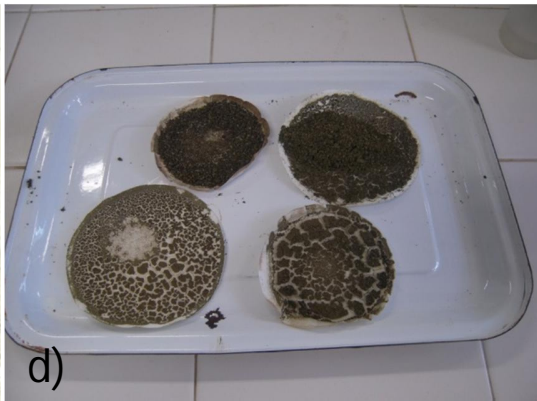
b)

b) Filtración al vacío.



c)

c) Biomasa Pretratada Húmeda.



d)

d) Biomasa Pretratada seca.

## **ANEXO D: EXTRACCIÓN DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO SOXHLET.**

### **Materiales y reactivos:**

- Manta de calentamiento.
- Equipo de extracción Soxhlet (matraz, tubo Soxhlet, condensador).
- Papel de filtro.
- Soporte universal.
- Espátula.
- Mortero.
- Embudo.
- Balanza analítica.
- Hexano.
- Cámara de extracción de vapores.

### **PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET**

1. Pesar 3g de biomasa pretratada.
2. Introducir la biomasa en el papel filtro y formar el cartucho.
3. En el matraz agregar 220 ml de hexano.
4. Hacer montaje Soxhlet.
5. Recuperación del solvente por medio de destilación.
6. Dejar volatilar el extracto y la biomasa residual en una cámara extracto hasta obtener peso constante.
7. Cuantificación del extracto por diferencia de masa.



a)

a) Biomasa macerada.



b)

b) Cartucho con biomasa.



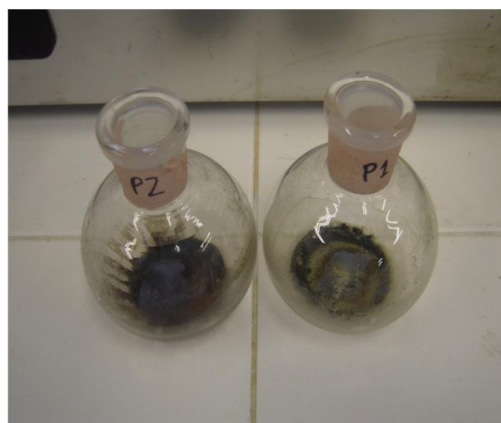
c)

c) Montaje Soxhlet.



d)

d) Solvente remanente



e) Extracto lipídico.

## **ANEXO E: EXTRACCIÓN DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO BLIGH & DYER.**

### **Materiales y reactivos:**

- Balanza analítica.
- SilentCrusher M.
- Probeta.
- Tubos de centrifuga.
- Centrifuga.
- Embudo.
- Papel filtro.
- Vaso de compota.
- Cloroformo.
- Metanol.

### **PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN**

1. Pesar 3 g de biomasa seca.
2. En una probeta agregar la biomasa y los solventes: 24 ml de metanol y 12 ml de cloroformo; agitar a 5000 rpm durante 10 minutos.
3. Agregar 12 ml de cloroformo y agitar durante 2 minutos.
4. Agregar 12 ml de agua y agitar durante 2 minutos.
5. Centrifugar a 3400 rpm durante 15 minutos.
6. Extraer la capa superior (metanol-agua) contenida en los tubos de centrifuga con un gotero.

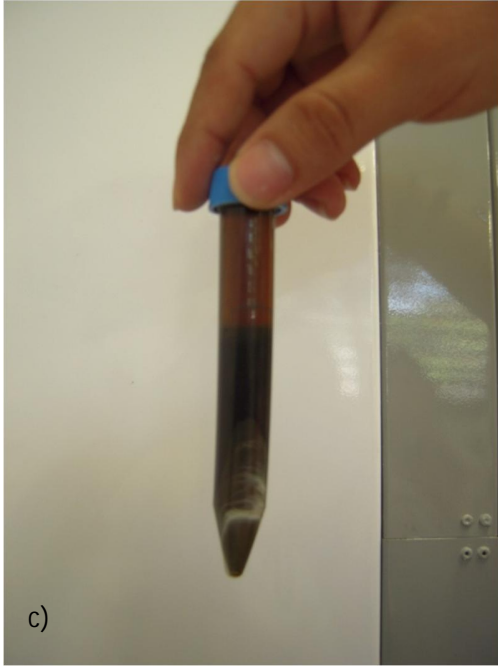
7. Realizar doble filtración por gravedad a la capa inferior contenida en los tubos de centrifuga.
8. Lavar los tubos de centrifuga con 15 ml de cloroformo.
9. Dejar volatilizarse el extracto y la biomasa residual en una cámara extractora hasta obtener peso constante.
10. Cuantificar el rendimiento de la extracción por diferencia de masas.



a) Agitación con solventes.

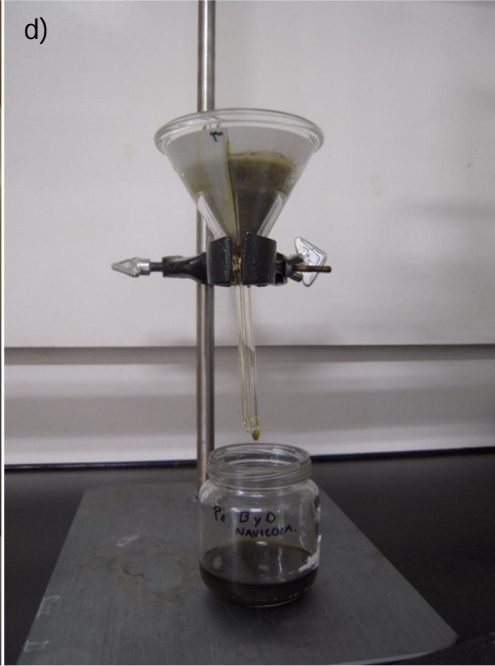


b) Centrifugación.



c)

c) Separación de fases.



d)

d) Filtración por gravedad.

## **ANEXO F: EXTRACCIÓN DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO IN SITU.**

### **Materiales y reactivos:**

- Balanza analítica.
- Plancha de agitación magnética.
- Equipo de filtración al vacío.
- Matraz de redondo de tres bocas.
- Hexano.
- Ciclohexano.

### **PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN**

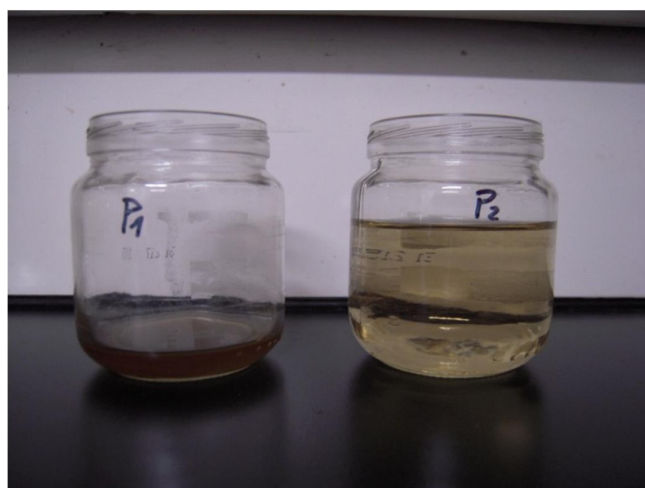
1. Se pesan 3g de biomasa pretratada.
2. Se adiciona al matraz 200ml de hexano o Ciclohexano.
3. Agitación durante 24 h a 500 rpm.
4. Filtrar la mezcla obtenida.
5. Dejar volatilizar el extracto y la biomasa residual en una cámara extractora hasta obtener peso constante.
6. Cuantificación del extracto por diferencia de masa.



a) Agitación.



b) Filtración al vacío.



c) Evaporación del solvente

## **ANEXO G: EXTRACCIÓN DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO ETANOL- HEXANO.**

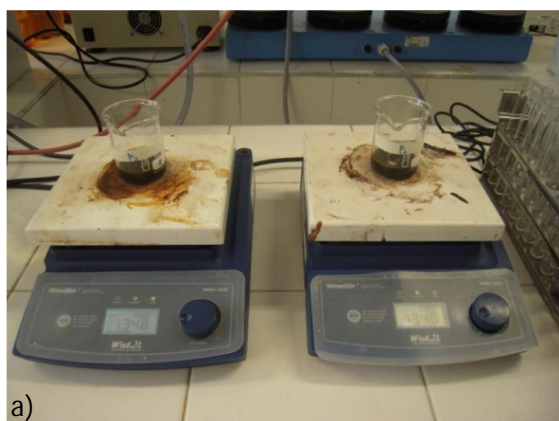
### **Materiales y reactivos:**

- Balanza analítica.
- Plancha de agitación magnética.
- Equipo de filtración al vacío.
- Embudo.
- Decantador.
- Erlenmeyer.
- Etanol.
- Hexano.

### **PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN**

1. Pesar 3g de biomasa pretratada.
2. Adicionar etanol a la biomasa pretratada en proporción 5mL/g biomasa.
3. Agitar la mezcla durante 14 h a 500 rpm y temperatura ambiente.
4. Filtrar la mezcla obtenida.
5. Adicionar etanol a la biomasa residual en proporción 5mL/g biomasa.
6. Agitar la mezcla durante 1 h a 500 rpm y temperatura ambiente.
7. Filtrar la mezcla obtenida.

8. Adicionar Hexano a la solución Hidroalcohólica obtenida de las extracciones con etanol en proporción 0.2mL/mL a temperatura ambiente.
9. Separa las fases por decantación.
10. Realizar 4 extracciones adicionales con hexano en proporción 0.2 mL/mL.
11. Dejar volatilizarse el extracto y la biomasa residual en una cámara extractora hasta obtener peso constante.
12. Cuantificación del extracto por diferencia de masa.



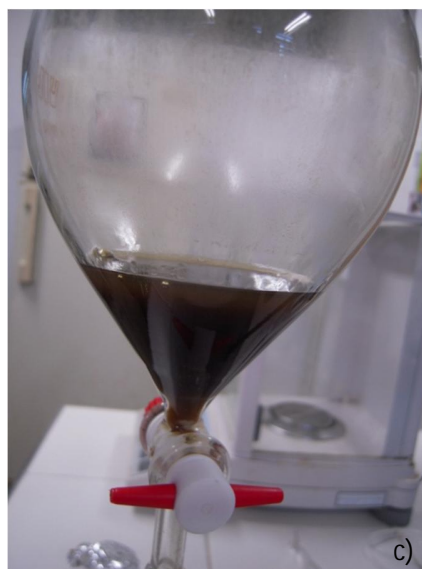
a)

a) Agitación.



b)

b) Filtración al vacío.



c)

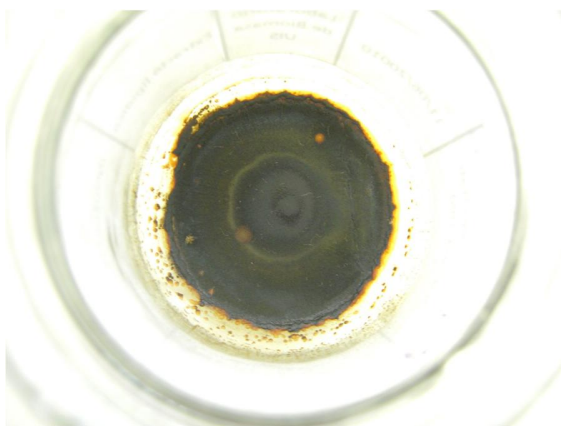
c) Separación de fases.



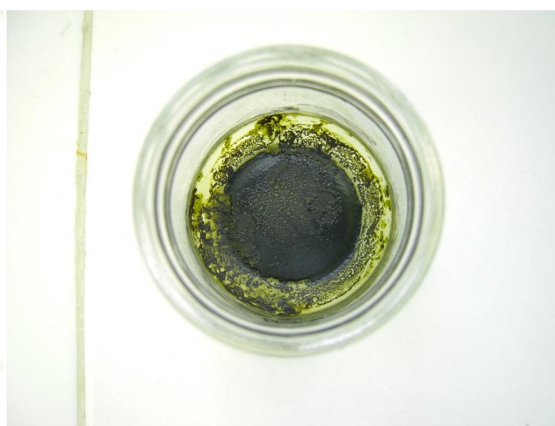
d)

d) Decantación.

## ANEXO H: EXTRACTOS LIPÍDICOS.



*Amphiprora* sp. Soxhlet



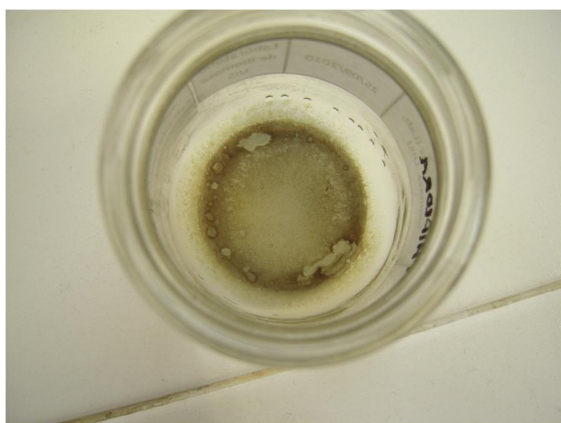
*Amphiprora* sp. Bligh & Dyer



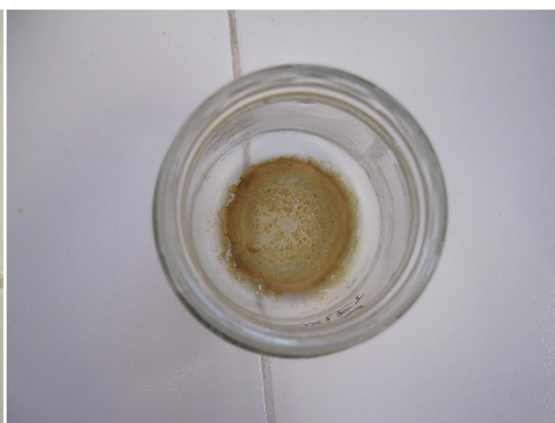
*Amphiprora* sp. Etanol-Hexano



*Amphiprora* sp. In situ Hexano



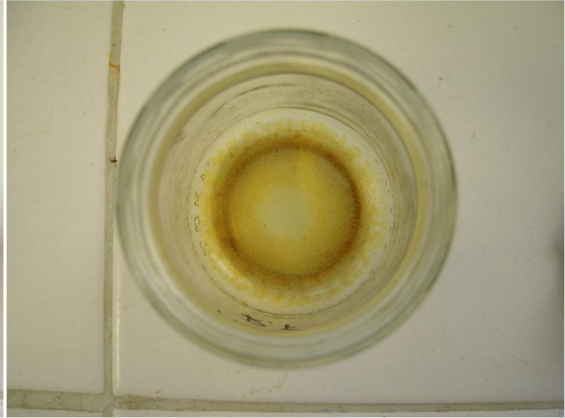
*Amphiprora* sp. In situ ciclohexano



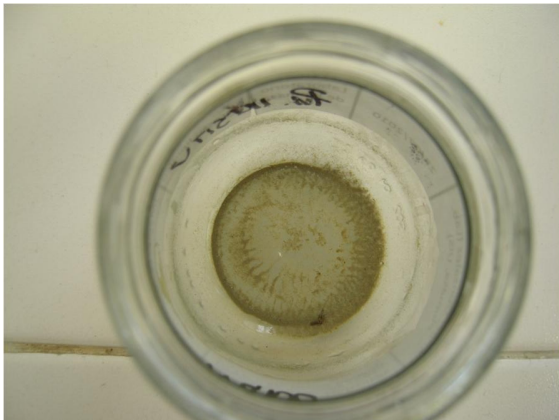
*Nannochloropsis* sp. Soxhlet



*Nannochloropsis* sp. Bligh & Dyer



*Nannochloropsis* sp. Etanol-Hexano



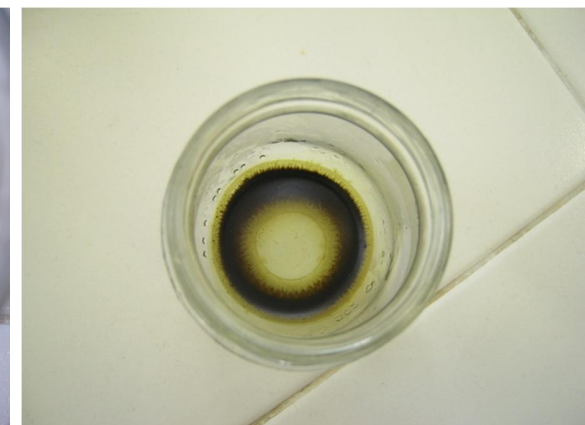
*Nannochloropsis* sp. In Situ Hexano



*Nannochloropsis* sp. In Situ Ciclohexano



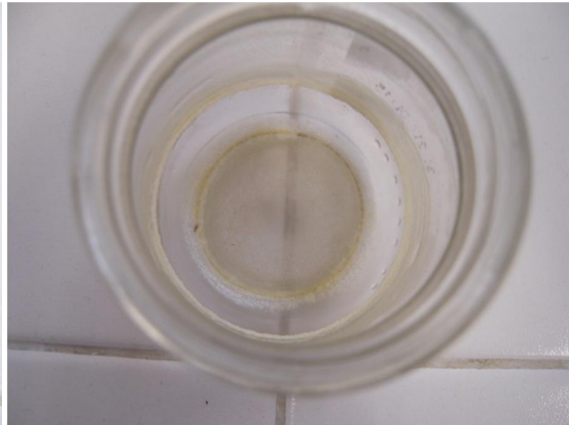
*Navicula* sp. Soxhlet



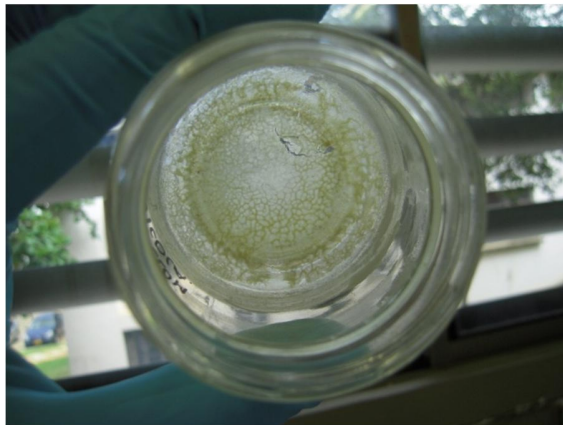
*Navicula* sp. Bligh & Dyer



*Navicula* sp. Etanol-Hexano



*Navicula* sp. In Situ Hexano



*Navicula* sp. In Situ Ciclohexano