

**ESTUDIO DEL PRETRATAMIENTO (METANOL-BASE) DE LA MICROALGA
Chaetoceros sp. PARA LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES
TOTALES.**

JULIETH MARCELA HERNÁNDEZ GARCÍA

ADRIANA JOYA PRADA

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

2010

**ESTUDIO DEL PRETRATAMIENTO (METANOL-BASE) DE LA MICROALGA
Chaetoceros sp. PARA LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES
TOTALES.**

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar el título de
Ingeniero Químico:

**JULIETH MARCELA HERNÁNDEZ GARCÍA
ADRIANA JOYA PRADA**

Director

VIATCHESLAV KAFAROV

Ingeniero Químico Dr. Sc.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Andrés Fernando Barajas Solano

Biólogo

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Codirectores

Laura Liliana Garzón Fuentes

Ingeniero Químico Msc.

INSTITUTO COLOMBIANO DE PETRÓLEO (ICP)

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

2010

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura por el proyecto bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiésel.

Al Instituto Colombiano del Petróleo por contar con el apoyo técnico de sus profesionales.

Al Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov, por confiar en nosotros, brindarnos la oportunidad de realizar nuestro trabajo de grado y por toda su colaboración.

Al Instituto Corporación Morrosquillo por el suministro de la biomasa.

A la Msc. Laura Liliana Garzón Fuentes por aportar su experiencia y desinteresada colaboración.

Al Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano, por su apoyo, dedicación y valiosas enseñanzas en el transcurso de este proyecto.

A Eduardo Carreño y Wilson Carreño, por su ayuda, enseñanzas y colaboración.

Al personal de los laboratorios de: procesos, biomasa, biotecnología, bioquímica y micología.

A la Universidad Industrial de Santander por la formación académica.

A nuestras familias y amigos por el constante apoyo y compañía.

A Dios, a mis padres y mis hermanitos por su apoyo incondicional.

A toda mi familia que me rodea de amor todos los días.

A mis amigos, quienes hicieron de mi paso por la universidad algo inolvidable.

A Adri, por estar conmigo en los buenos y malos momentos de ésta historia.

Al teatro que me brindó, me brinda y me brindará momentos muy felices.

Julieth Marcela Hernández García.

*A Dios por darme el maravilloso privilegio de vivir,
A Deisy, mi madre quien es mi motor y centro de gravedad,
A mis abuelos Ofelia Ardila y Miguel Prada, por ser mis ángeles de la guarda,
A Fabian por alegrar mi vida con su cariño y ser como mi hermano,
A mis tías y primos por siempre estar ahí,
A Julieth por ser mi gran amiga, por su gran paciencia y estar siempre conmigo,
A todos mis amigos especialmente a: Julieth, Laura, Lilibeth, Andrea, Johana, Jaime,
Tania, Karina, Oscar, Lina, Silvia, Astrid, Catalina, Paola, Fabio y Diana por hacer
parte de esta gran aventura de mi vida "LA UNIVERSIDAD".*

Adriana Joya Prada

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	
1.1. Microalgas	3
1.1.1. Composición de las microalgas	3
1.1.1.1. Carbohidratos	4
1.1.1.2. Proteínas	4
1.1.1.3. Lípidos	4
1.1.2. Especies de <i>Chaetoceros</i>	5
1.2. Pretratamiento	6
1.2.1. Organosolv	6
1.2.1.1. Procesos con metanol: MD Organocell y Organocell	7
1.3. Hidrólisis	8
1.3.1. Hidrólisis ácida	9
1.4. Diseño experimental	9
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	10
2.1. Materiales, reactivos y equipos	10
2.1.1. Materia prima	10
2.2. Procedimiento experimental	10
2.2.1. Secado Materia Prima	10
2.2.2. Pretratamiento	10
2.2.2.1. Método Organosolv metanol-soda	11
2.2.2.2. Preparación del Licor	11
2.2.2.3. Mezcla licor-biomasa	11
2.2.2.4. Separación licor negro-biomasa	11

2.2.3. Hidrólisis de la biomasa pretratada	11
2.2.3.1. Hidrólisis ácida	11
2.2.3.2. Separación licor hidrólisis-biomasa	12
2.2.4. Determinación de la concentración de azúcares reductores totales (ART)	12
2.2.4.1. Cuantificación de los ART	12
2.2.5. Análisis de resultados a través de STATISTICA 7.0	12
3. RESULTADO Y ANÁLISIS	12
3.1. Caracterización de la materia prima	12
3.2. Pruebas preliminares	13
3.3. Diseño central compuesto (DCC) del pretratamiento	15
3.3.1. Análisis de los efectos principales e interacción de las variables en el pretratamiento	18
3.3.1.1. Efecto de la interacción metanol-soda	19
3.3.1.2. Efecto de la interacción soda-tiempo	20
3.3.1.3. Efecto de la interacción metanol-tiempo	20
3.4. Optimización del mejor pretratamiento	21
CONCLUSIONES	25
RECOMENDACIONES	26
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	27
ANEXOS	31

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Hemicelulosa	8
Figura 2. Celulosa	8
Figura 3. Reacciones de hidrólisis	8
Figura 4. Porcentaje de ART obtenidos en el pretratamiento	17
Figura 5. Pérdidas de biomasa en el pretratamiento	17
Figura 6. Pérdidas de biomasa en la hidrólisis	18
Figura 7. Diagrama de Pareto	18
Figura 8. Superficie (a) y curva de nivel (b), para tiempo de 90 min	19
Figura 9. Superficie (a) y curva de nivel (b), para un valor de metanol de 1.36%v/v	20
Figura 10. Superficie (a) y curva de nivel (b), para un valor de soda de 0.32%w/w.	20
Figura 11. Porcentaje de ART obtenido en el pretratamiento para los ensayos con mayor liberación de ART	23
Figura 12. Pérdida de biomasa en el pretratamiento para los experimentos con mayor liberación de ART	24
Figura A1. Diagrama esquemático del pretratamiento experimental	33
Figura E1. Primera curva de glucosa	41
Figura E2. Segunda curva de glucosa	42
Figura F1. Etapa de pretratamiento	43
Figura F2. Pre-hidrólisis de la biomasa pretratada y/o sin pretratar	43
Figura F3. Hidrólisis de la biomasa pretratada y/o sin pretratar	44
Figura F4. Cuantificación de los ART a los licores de pretratamiento e hidrólisis	44
Figura F5. Filtración a vacío para la etapa de pretratamiento y la etapa de hidrólisis	45
Figura F6. Secado para las etapas de pretratamiento e hidrólisis	45

Figura G1: Superficie de respuesta para $t=9.55$ min	46
Figura G2: Superficie de respuesta para $t=30$ min	46
Figura G3: Superficie de respuesta para $t=60$ min	47
Figura G4: Superficie de respuesta para $t=110.45$ min	47
Figura G5: Superficie de respuesta para $\text{NaOH}=1$ % m/m	48
Figura G6: Superficie de respuesta para $\text{NaOH}=2$ % m/m	48
Figura G7: Superficie de respuesta para $\text{NaOH}=3$ % m/m	49
Figura G8: Superficie de respuesta para $\text{NaOH}=3.68$ % m/m	49
Figura G9: Superficie de respuesta para metanol= 15 % V/V	50
Figura G10: Superficie de respuesta para metanol= 35 % V/V	50
Figura G11: Superficie de respuesta para metanol= 55 % V/V	51
Figura G12: Superficie de respuesta para metanol= 68.64 % V/V	51

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1: Clasificación de algunas especies de Microalgas	5
Tabla 2: Caracterización de <i>Chaetoceros gracilis</i> según la Universidad de Antioquia (UDEA)	5
Tabla 3: Tipo de pretratamientos	6
Tabla 4: Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Chaetoceros</i> Sp.	13
Tabla 5: Pruebas preliminares MD Organocell y Organocell	14
Tabla 6: Preliminares con glucosa variando la composición de soda	14
Tabla 7: Pretratamiento e hidrólisis ácida a la microalga <i>Chaetoceros calcitrans</i> con diferentes Catalizadores	15
Tabla 8: Factores y niveles del pretratamiento	15
Tabla 9: Matriz de diseño experimental central compuesto 2^3 con respuesta de % ART obtenido en cada uno de los ensayos	16
Tabla 10: Efectos e interacciones arrojados por STATISTICA 7.0	18
Tabla 11: Niveles para reemplazar en la ecuación 3.3.8	21
Tabla 12: Análisis de varianza (ANOVA) para la producción de ART	22
Tabla 13: Ensayos de regiones de mayor liberación de ART	23
Tabla A1: Reactivos utilizados	31
Tabla A2: Material utilizado	32
Tabla A3: Equipo utilizado	32
Tabla B1. Composición del medio f/2	34
Tabla B2. Composición de trazas metálicas para el medio f/2	34
Tabla B3. Composición de vitaminas para el medio f/2	34
Tabla C1. Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Chaetoceros gracilis</i> (10 días de cultivo), floculada con 150 ppm de $FeCl_3$, por el Instituto Colombiano del Petróleo	36
Tabla C2. Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Chaetoceros gracilis</i> (10 días de cultivo), floculada con 150 ppm de $FeCl_3$, por La	36

Universidad de Antioquia (UDEA)

Tabla C3. Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Chaetoceros gracilis</i> (10 días de cultivo), floculada con 150 ppm de FeCl ₃ , en el laboratorio	37
Tabla C4. Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Chaetoceros calcitrans</i> (3 días de cultivo), floculada con 150 ppm de FeCl ₃ , en el laboratorio	37
Tabla C5. Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Chaetoceros gracilis</i> (3 días de cultivo), floculada con 150 ppm de FeCl ₃ , en el laboratorio	37

LISTA DE ANEXOS

	Pág
ANEXO A: Reactivos, materiales y equipos	31
ANEXO B: Medio F/2	34
ANEXO C: Caracterización de la biomasa	36
ANEXO D: Análisis de la materia prima	38
ANEXO E: Método de cuantificación de Azúcares Reductores Totales (ART)	40
ANEXO F: Ilustración de las principales etapas del desarrollo experimental realizado en el laboratorio	43
ANEXO G: Superficies de respuesta arrojadas por STATISTICA 7.0	46

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL PRETRATAMIENTO (METANOL-BASE) DE LA MICROALGA *Chaetoceros* sp. PARA LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES*

AUTORES: Julieth Marcela Hernández García
Adriana Joya Prada**

PALABRAS CLAVES: Microalgas, *Chaetoceros* sp., pretratamiento, organosolv, carbohidratos, ART.

DESCRIPCIÓN

Una de las posibles fuentes de energía renovables, son los biocombustibles (biodiésel y bioetanol) a partir de microalgas. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del pretratamiento (metanol-base) de la microalga *Chaetoceros* sp. para la producción de azúcares reductores totales (ART) y realizar su posterior hidrólisis para la cuantificación de azúcares reductores residuales en la biomasa pretratada.

El trabajo experimental se llevó a cabo realizando el pretratamiento MetOH-NaOH con la microalga *Chaetoceros* sp. cultivada por el Instituto Corporación Morrosquillo, usando como reactivos agua-metanol-soda y elevando la temperatura hasta 121°C. Después se separó la biomasa del licor; el licor fue llevado a medición de ART y a la biomasa pretratada se le aplicó una hidrólisis para cuantificación de los ART retenidos en ella. El pretratamiento en el cual se obtuvo la mayor obtención de ART fue el realizado con metanol 0%V/V, soda 0.32% W/W y tiempo de reacción 90 min, con un rendimiento del 16.63%. De este modo, este proceso es viable desde el punto de vista económico, ya que los porcentajes de reactivos empleados son bajos.

El anterior trabajo de grado fue realizado dentro del desarrollo del proyecto: Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiésel código: 2008D3871-3665, financiado por el Ministerio de agricultura, en cooperación con el Instituto Colombiano del Petróleo y el Instituto de Morrosquillo.

*Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico. Modalidad trabajo de investigación.

**Facultad de Ingenierías Físico-químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov, Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano. Codirector: Msc. Laura Liliana Garzón Fuentes ICP-ECOPETROL.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE MICROALGAE *Chaetoceros* sp. PRETREATMENT (METHANOL-BASE) FOR THE PRODUCTION OF TOTAL REDUCING SUGARS*

AUTHORS: Julieth Marcela Hernández García
Adriana Joya Prada**

KEY WORDS: Microalgae, *Chaetoceros* sp, pretreatment, organosolv, carbohydrates, ART.

DESCRIPTION:

One of the possible sources of renewable energy is bio-fuel (biodiesel and bio-ethanol) from microalgae. The purpose of this work is to evaluate the microalgae *Chaetoceros* sp. pretreatment (methanol-base) for the production of total reducing sugars' effect and carry out its subsequent hydrolysis for the quantification of residual reducing sugars on the pretreated biomass.

The experimental work was conducted by pretreatment MeOH-NaOH, the microalgae *Chaetoceros* sp. Was cultured by the Institute Corporation Morrosquillo, using water-methanol-soda as reagents and raising the temperature to 121 ° C. Then the biomass was separated from the liquor, the liquor was taken to measure ART and the pretreated biomass was applied a hydrolysis for quantification of ART retained in it. The pretreatment in which was the biggest acquisition of ART was conducted with methanol 0% V / V, soda 0.32% W / W and reaction time 90 min, with a yield of 16.63%. Thus, this process is feasible from the economic viewpoint, since the percentages of reagents used are low.

The following thesis was done within the project: Bioprospecting of Colombian microalgae for biodiesel production, code: 2008D3871-3665 funded by the Ministry of Agriculture, in cooperation with the Colombian Petroleum Institute and the Institute of Morrosquillo.

*Working Grade qualify for the title of Chemical Engineering. Research Mode.

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

INTRODUCCIÓN

Cada día las reservas mundiales de combustibles fósiles son menores y los costos de éstos en el mercado mundial aumentan exorbitantemente. Esta situación ha motivado a debatir sobre la inversión en investigación y desarrollo de nuevas fuentes de energía. En este sentido, una de las posibles fuentes de energía renovables, son los biocombustibles (biodiésel y bioetanol) a partir de microalgas. Es por esto, que el Ministerio de Agricultura junto con el Instituto Colombiano de petróleo (ICP), el Instituto de Morrosquillo y la Universidad Industrial de Santander, han decidido indagar en este campo, teniendo en cuenta que las materias primas usadas en procesos de producción de biocombustibles representan un gran problema en el ámbito ambiental y alimentario.

Las microalgas presentan características promisorias como potencial materia prima para la producción de biocombustibles teniendo en cuenta que pueden realizar la síntesis de sus propios alimentos, su crecimiento es rápido, su estructura unicelular es muy eficiente en el uso de la luz, absorción de nutrientes, CO₂ y NO₂; siendo éstos últimos productos contaminantes provenientes de la industria. Además, la producción de microalgas no compite con la agricultura tradicional, usan 99% menos agua que la convencional y pueden estar localizadas en terrenos no aptos para la agricultura como el desierto o en espacios cerrados como pilas. Todas éstas características, su pequeño tamaño celular (<30 µm) y su naturaleza acuática, las hacen ideales para sistemas de producción de biocombustibles a escala industrial [1].

El objetivo de éste trabajo fue evaluar el potencial de producción de azúcares fermentables a partir de la biomasa de microalgas como materia prima, para ello se propuso aplicar una metodología de pretratamiento organosolv (metanol-soda) y su posterior hidrólisis para la cuantificación de azúcares reductores. Se buscó la concentración de metanol y de base, y el tiempo de cocción óptimos para el

pretratamiento. La producción de azúcares reductores totales se determinó colorimétricamente por el método del ácido dinitrisalicílico. Inicialmente se tomaron las condiciones de un proceso MD Organocell [2] y posteriormente un proceso Organocell [3]; se concluyó que eran condiciones muy drásticas para el tipo de biomasa tratada, por lo que se suavizaron las condiciones del proceso Organosolv convencional.

1. MARCO TEÓRICO

El estudio de nuevos combustibles constituye uno de los campos de trabajo más interesantes de investigación y esfuerzos del desarrollo científico.

El bioetanol puede producirse a partir de cualquier materia prima que pueda ser convertida en azúcar fermentable. En consecuencia, las materias primas para la obtención de bioetanol se pueden clasificar en tres grandes grupos: Las sustancias ricas en sacarosa, en almidón y en celulosa. Nuevos estudios realizados indican que se puede obtener bioetanol a partir de microalgas y que tienen muchas ventajas por encima de los demás materiales utilizados [4].

1.1. Microalgas

Las microalgas como microorganismos eucariotas fotosintéticos son capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a la de las plantas [5]. Los cultivos de microalgas son identificados mundialmente como fuentes de proteínas, grasas, carbohidratos y vitaminas, las cuales varían según la especie de que se trate [6].

El uso más extendido de las microalgas es base de la cadena trófica de la acuicultura, ya que son necesarias para el alimento de larvas de peces y crustáceos en sus primeros estadios, directamente o bien como alimento de las presas vivas que se utilizan en los distintos estadios larvarios. Son una fuente potencial de proteína para su uso en alimentación humana y animal, capaces de secuestrar el CO₂ que se libera a la atmósfera por parte de las actividades humanas y pueden ser utilizadas en la purificación de efluentes y para la producción de biocombustibles [7].

1.1.1. Composición de las microalgas

La composición química de las microalgas es muy variable debido a factores tales como especie, época del año, nutrientes, temperatura, fotoperiodo, salinidad, fuente de carbono, intensidad y color de la luz entre otros [8].

En el trabajo hecho por Ben-Amotz et al., [9] se estudiaron 5 diferentes tipos de microalgas y su composición química fue en promedio para proteína 30%, carbohidratos 25%, Lípidos 21% y el resto de otros compuestos no clasificados. En particular la composición química de *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros calcitrans*, se muestran en las Tablas C1, C2, C3, C4, y C4 (ANEXO C).

1.1.1.1. Carbohidratos

Los carbohidratos presentes en células diatomeas son reservas de polisacárido y constituyentes de la pared celular [10]. Los principales azúcares son glucosa, galactosa, manosa y ribosa, con otros azúcares en proporciones variables. El perfil de carbohidratos varía gradualmente en las diferentes especies de algas [11].

Además debido a la fuente y concentración de nitrógeno afectan el contenido de carbohidratos por célula [12].

La intensidad de luz es otro factor que afecta la composición bioquímica de las algas [13].

1.1.1.2. Proteínas

Los aminoácidos constituyen un 90-98% del total de proteína. El valor nutricional de la proteína está determinado por su contenido y disponibilidad de aminoácidos. Las proporciones de aminoácidos individuales no varían entre las diferentes especies de algas [16].

La composición de aminoácidos del alga es totalmente similar a la proteína del huevo de gallina (la que es considerada de alta calidad nutricional para el humano), sin embargo este último es rico en metionina y bajo en arginina [17].

1.1.1.3. Lípidos

La mayoría de los lípidos de las microalgas son ésteres de glicerol y ácidos grasos [9]. La composición de los lípidos puede variar por diversos factores como son la combinación de luz, nutrientes, nitrógeno (nitratos) y temperatura [9].

La fracción de lípidos puede ser dividida en dos categorías: lípidos polares (los cuales incluyen los fosfolípidos y fracciones glicolípidas) y los lípidos neutrales (los

cuales incluyen los triglicéridos, diglicéridos, hidrocarburos, alquenones, esteroides y pigmentos) [14].

Tabla 1: Clasificación de algunas especies de microalgas

Microalga	Carbohidratos	Lípidos	Proteínas
<i>Chaetoceros sp.</i>	8,1	6,9	35
<i>Skeletonema costatum</i>	23	4,7	37
<i>Tretraselmis maculata</i>	16,9	2,9	52
<i>Dunaliella salina</i>	34,6	6,4	57
<i>Chlorella sp.</i>	27	15	53
<i>Monochrysis lutheri</i>	32,6	11,5	49

1.1.2. Especies de *Chaetoceros*.

La especie a tratar es *Chaetoceros gracilis* Pantocsek 1892, y *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* Takano son algas diatomeas o alga de color café. Su pared celular está compuesta de peptina y sílice, y presenta cloroplastos de tamaño y número variable; tiene la capacidad de formar pequeñas colonias [16].

Diatomeas céntricas (clase Coscinopiscophyceae), de forma rectangular, cuyas dimensiones varían entre 5 a 7 mm. de diámetro por 7 a 10 mm. de longitud, no forman cadenas en su medio natural ni en medio de cultivo artificial [16]. Son ovals en su sección transversal y tienen los extremos planos [16]. A cada extremo del frústulo se encuentra un par de espinas (setas) [16]. Es usada especialmente en la alimentación de larvas de crustáceos y larvas de camarón en los laboratorios especializados [17]. Su composición química es: Proteína cruda 23,9%, lípidos 8.7% y carbohidratos 19% [18].

En éste caso particular, lo que nos interesan son los carbohidratos que serán convertidos a azúcares y posteriormente a etanol.

Tabla 2: Caracterización de *Chaetoceros gracilis* según La Universidad de Antioquia (UDEA)

Composición	Porcentaje
Carbohidratos totales	17,27
Humedad	11,53
Cenizas	61,74

1.2. Pretratamiento

La función del pretratamiento es hacer al material más susceptible y accesible para la etapa posterior. Con la aplicación del pretratamiento se consigue:

- Remover parcial o totalmente la lignina y la hemicelulosa.
- Disminuir la cristalinidad de la célula.
- Reducir el tamaño de las partículas del material.

Tabla 3: Tipos de Pretratamiento

Tecnologías y procesos actuales para el pretratamiento	
Físicos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fragmentación mecánica ▪ Pirolisis
Físico-Químicos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Explosión con vapor (auto-hidrólisis) ▪ Explosión de fibra con amoníaco (AFEX) ▪ Explosión con CO₂
Químicas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ozonólisis ▪ Hidrólisis ácida ▪ Hidrólisis alcalina ▪ Deslignificación oxidativa ▪ Proceso Organosolv
Biológicas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Uso de microorganismos ▪ Procesos enzimáticos (celulasas)

Procesos altamente demandantes de energía, que elevan costos en el pretratamiento.

Pretratamiento secundario, menor demanda de energía y mayor tiempo de tratamiento.

Fuente: Y Sun; J Cheng/Bioresource Technology 8 2002) 1-1

1.2.1. Organosolv

El método de pretratamiento Organosolv se ha usado en principio como método para pastero y posteriormente en la industria de los biocombustibles para atacar la pared de materiales tales como el bagazo de caña de azúcar, cuya pared necesita de un pretratamiento para la posterior hidrólisis. La conversión de materiales lignocelulósicos a etanol incluye dos etapas fundamentales: Hidrólisis de la celulosa a azúcares reductores fermentables y la fermentación de los azúcares a etanol. Sin embargo, es necesario un pretratamiento que permita eliminar la lignina y la hemicelulosa (o solubilizarla) y reducir la cristalinidad de la

celulosa, entre otros fines, para aumentar significativamente los resultados en las etapas mencionadas. Para el caso de las microalgas se hace necesario desordenar su pared para lograr una mejor penetrabilidad y acceso a los carbohidratos que en ella se encuentran.

En los procesos de pasteado que utilizan disolventes orgánicos (procesos Organosolv) se han empleado alcoholes como el metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol y glicoles; ácidos orgánicos como el ácido acético y ácido fórmico; fenoles y cresoles; acetato de etilo, aminas y óxido de aminas, cetonas, dioxano, etc [2]. Sin embargo, sus elevados precios, la dificultad de su recuperación y en muchos casos su elevada toxicidad, han favorecido sólo el uso de alcoholes de bajo peso molecular, principalmente etanol y metanol [2]. Estos son los más antiguos disolventes orgánicos usados como deslignificantes en pasteado [2,19]; donde aparece entre los procesos más clásicos el descrito por Kleinert en 1974 [20], que utiliza etanol o metanol sobre astillas prevaporizadas. Éstos procesos Organosolv se han desarrollado a nivel de planta piloto o a escala comercial y se destacan los procesos Alcell, MD-Organocell, ASAE, Organocell y ASAM [2].

1.2.1.1. Procesos con metanol: MD Organocell Y Organocell

El proceso *MD Organocell* utiliza metanol y sosa, y puede considerarse como complementario pero no competitivo del kraft, pudiendo sustituir a éste de forma prometedora en países donde no existen fábricas kraft [3]. Frente al proceso Alcell tiene como ventaja que puede aplicarse a maderas coníferas, dando lugar a pastas más resistentes que las kraft, y a mezclas de maderas coníferas y frondosas, pero se necesita recuperar la sosa y el alcohol [2].

El proceso *Organocell* utiliza, además de metanol y de sosa, antraquinona. Las condiciones típicas de operación son: 17-22% de hidróxido sódico, 0,1% de antraquinona, 25-30%-v de metanol, 4:1 de relación "líquido/ sólido", 155-170 °C y 60-120 minutos. En la primera etapa, debido a la alta concentración de metanol, no se producen reacciones de condensación de la lignina, y en la segunda, donde

la concentración de alcohol es baja, es la antraquinona añadida la que las evita. Este proceso se ha aplicado también a la paja de trigo y al amaranto [2,3].

1.3. Hidrólisis

Es un proceso químico que rompe un enlace en presencia de agua y produce uno o varios compuestos. El término hidrólisis se aplica a reacciones químicas que bien pueden ser orgánicas o inorgánicas.

Los recursos lignocelulósicos están formados por tres polímeros: celulosa (6C), hemicelulosa (5C)(En las Figura 1 y 2), y lignina. De los dos primeros, por hidrólisis, se obtiene una mezcla de azúcares (6C y 5C) [21]. En el caso de un polisacárido, la hidrólisis del enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio, donde el hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar y el $-OH$ se une al carbono libre del otro residuo de azúcar [22].

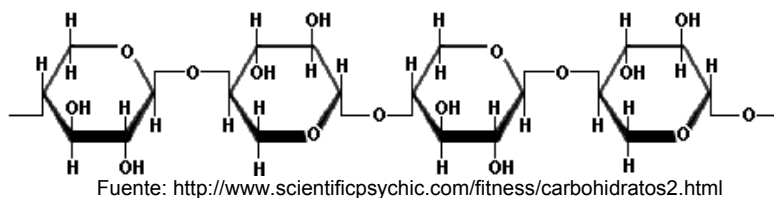


Figura 1. Hemicelulosa

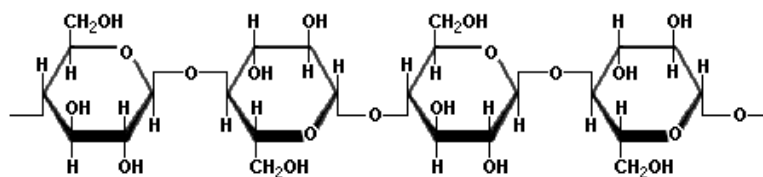


Figura 2. Celulosa

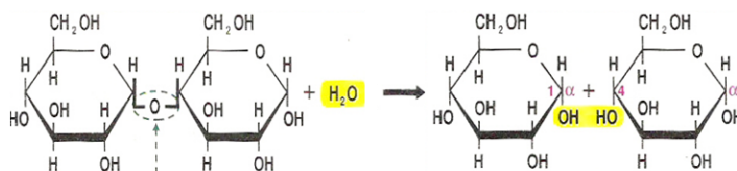
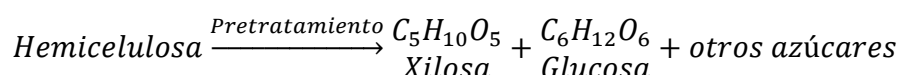


Figura 3. Reacción de hidrólisis

1.3.1. Hidrólisis ácida

Es un proceso químico, que mediante el empleo de catalizadores ácidos transforma las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (Hemicelulosa, celulosa) en sus monómeros elementales; de ésta manera se obtienen los azúcares necesarios para la fermentación [23].



El ataque con ácido es el método más usado para la obtención de caldos fermentables a partir de materiales lignocelulósicos, y ha sido intensamente investigado y desarrollado en la mayor parte del siglo XX.

1.4. Diseño experimental

El diseño experimental tiene como finalidad ayudar en la preparación y ejecución de experimentos, y en el análisis de los resultados, sea a escala de laboratorio o a escala industrial. Esta metodología permite obtener un gran número de informes con un número reducido de experimentos, minimizando tiempo y costos operacionales, además de obtener un análisis más racional de los resultados, basado en probabilidades estadísticas.

En caso que se quieran estudiar los efectos de los factores sobre una o más respuestas, podemos utilizar un planeamiento factorial completo 2^n , donde n es el número de factores estudiados [25].

En el momento en que el modelo no describa satisfactoriamente la superficie de respuesta, es necesario ampliar el diseño [24]. El diseño central compuesto (DCC), también llamado diseño “estrella”, es el diseño experimental más usado cuando se requiere ajustar modelos de segundo orden y evaluar interacciones de factores sobre una variable de respuesta; donde se calculan los nuevos valores o puntos axiales [24]. Para el diseño factorial 2^3 , los puntos axiales serán -1,68 y +1,68, quedando el diseño extendido a una mayor línea.

2.METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. Materiales, reactivos y equipos

Durante los diferentes pasos de la metodología experimental se utilizaron los reactivos, materiales y equipos que se muestran en las Tablas A1-A3 del Anexo A respectivamente. La figura A1 en el Anexo A, muestra de forma esquemática el procedimiento experimental.

2.1.1. *Materia prima*

Se trabajó con tres tipos de microalgas de la especie *Chaetoceros* Sp. cultivadas en medio F/2 (ANEXO B). Las tres proporcionadas por el Instituto de Morrosquillo.

Las pruebas preliminares se llevaron a cabo con *Chaetoceros gracilis* con diez días de cultivo y *Chaetoceros calcitrans* con tres días de cultivo; floculadas con 150 y 30 ppm de FeCl_3 respectivamente. El diseño experimental se llevó a cabo con *Chaetoceros gracilis* cultivada durante 3 días, floculada con 30 ppm FeCl_3 (ANEXO C).

2.2. Procedimiento experimental

2.2.1. *Secado Materia Prima.*

Se agregó agente floculante (FeCl_3) a la solución de microalga *Chaetoceros* sp., se dejó precipitar y se decantó la parte líquida. Luego, la solución fue expuesta al sol para su secado total.

2.2.2. *Pretratamiento.*

Para el diseño de experimentos se llevaron a cabo algunas pruebas preliminares para determinar el rango dentro del cual debía manejarse la Soda, ya que grandes cantidades de esta degradan la glucosa. Para las pruebas preliminares se varió la concentración de soda, experimentando con glucosa analítica en lugar de biomasa.

Las variables de proceso estudiadas en el diseño fueron: Concentración de soda (% m/m), concentración de metanol (%V/V) y tiempo de reacción (min).

2.2.2.1. Método Organosolv metanol-soda

Las condiciones del método Organocell fueron suavizadas a lo largo del método experimental, debido a que la pared de la especie de microalga tratada no necesitó condiciones agresivas como los métodos de pulpeo que requieren condiciones drásticas para la solubilización de la lignina. Las condiciones del autoclave fueron constantes para todos los experimentos (15 psi y 121°C) y el tiempo de reacción fue variado según lo estipulado en el diseño experimental (Tablas 4, 5, 6 y 8).

2.2.2.2. Preparación del licor

Se prepararon 100mL de solución metanol, hidróxido de sodio y agua destilada, a las concentraciones mostradas en las Tablas 5, 6, 7, 9 y 13.

2.2.2.3. Mezcla licor-biomasa

La relación licor-biomasa fue de 10:1 líquido/sólido [26]

2.2.2.4. Separación licor negro-biomasa

En esta etapa, terminado el tiempo de reacción la biomasa se filtra al vacío. El licor del filtrado es utilizado para la determinación de azúcares reductores totales (ART). La biomasa retenida es llevada a un proceso de lavado y secado según la norma NREL/TP-42621 (ANEXO D).

2.2.3. Hidrólisis de la biomasa pretratada.

2.2.3.1 Hidrólisis ácida

Se mezclaron 10 mL de H₂SO₄ al 72% con 1.0g de biomasa pretratada, en un baño de agua a 30 °C, agitando cada 10 min durante 1 h. Luego se diluye la mezcla con 280 mL de agua destilada y se llevó a la autoclave por 1 hora más. Este procedimiento se realiza basado en la norma NREL/TP-510-42618 (ANEXO D).

2.2.3.2. Separación licor hidrólisis-biomasa

En esta etapa, terminado el tiempo de reacción la biomasa se filtra al vacío. El licor del filtrado es utilizado para la determinación de ART. La biomasa retenida es llevada a un proceso de lavado y secado según la norma NREL/TP-42621 (ANEXO D).

2.2.4. Determinación de la concentración de Azúcares Reductores Totales (ART).

Los ART provenientes de la etapa de pretratamiento y de la hidrólisis ácida se determinaron por el método del ácido dinitrosalicílico descrito por MILLER 1959 (ANEXO E).

2.2.4.1. Cuantificación de los ART

Se agregó 0,5 mL de muestra concentrada y/o diluida, y 0,5 mL de DNS, se sometió a un baño a 100°C durante 5 min, la reacción se detiene sumergiendo las muestras en un baño frío y adicionando 5 mL de agua. Las lecturas son medidas en un espectrofotómetro a 540 nm.

2.2.5. Análisis de los resultados a través de STATISTICA 7.0

Para el análisis estadístico fue tomada como variable de respuesta la concentración de ART del pretratamiento. El programa computacional utilizado fue STATISTICA 7.0.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Caracterización de la materia prima

La Tabla 3.1., muestra la caracterización que se realizó para las tres especies de microalgas trabajadas a lo largo del estudio del pretratamiento metanol-base para la producción de ART (ANEXO C y D).

Tabla 4: Análisis efectuados sobre las muestras de *Chaetoceros* sp.

Análisis	Resultados		
	<i>Chaetoceros gracilis</i> (10 días de cultivo)	<i>Chaetoceros calcitrans</i> (3 días de cultivo)	<i>Chaetoceros gracilis</i> (3 días de cultivo)
%Humedad	14,85	8,46	5,66
%Cenizas	44,92	45,65	58,83
% Lípidos	1,23	3,24	2,38
% carbohidratos	17	6,47	5,29

3.2. Pruebas preliminares

Se realizó una serie de pruebas preliminares para encontrar los rangos en los cuales trabajar. Este paso se requiere debido a que en la literatura no se reportan estudios de pretratamientos para microalgas. En la Tabla 4. Se muestran las tres variables de proceso con las condiciones típicas especificadas para el pretratamiento MD Organocell y Organocell [1,2]. La concentración de soda fue variada en algunos experimentos, debido a la degradación de carbohidratos observada en las pruebas hechas con glucosa mostradas en la tabla 5. Adicionalmente, se realizaron unas pruebas con un ácido y una base débil, CH_3COOH y $\text{Ca}(\text{OH})_2$, respectivamente. Tabla 6.

En la Tabla 5., se observa que:

El pretratamiento logra desordenar la pared celular de la microalga. Las condiciones favorables para el pretratamiento con una concentración de solvente de 50% V/V se logran a:

- Altas concentraciones de soda y menor tiempo (ensayo 1), donde al disminuir el tiempo de reacción comparado con el ensayo 3 aumenta el % ART.
- Menor cantidad de soda y mayor tiempo: esto se comprueba con los ensayos 4, 5 y 7, que a su vez muestran menor degradación de carbohidratos.

El uso de antraquinona (AQ) como agente inhibidor de la reacción de peeling de los carbohidratos, es irrelevante, ya que la mayor extracción se obtiene en ausencia de ésta (ensayo 1). Al comparar los ensayos 1, 3 y 6, se observa que a condiciones iguales de solvente y catalizador, disminuyendo el tiempo se puede evitar el uso de AQ.

Tabla 5: Pruebas preliminares MD Organocell y Organocell.

Ensayo	Condiciones Pretratamiento				% ART biomasa seca (g. ART/100 g. biomasa seca)		
	Tiempo (min)	Metanol (% V/V)	NaOH (%m/m)*	AQ (1%)*	Pretratamiento	Hidrólisis	Totales
1	30	50	25	No	1,13	1,19	2,32
2	120	50	0	No	1,28	1,33	2,61
3	120	50	25	No	0,46	0,47	0,93
4	180	50	1	No	0,54	7,00	7,54
5	180	50	0,5	No	0,53	4,94	5,47
6	180	50	25	Si	0,65	1,72	2,37
7	180	50	0,5	Si	0,96	2,77	3,73
8	180	0	0	No	0,83	1,94	2,77
9	180	0	25	Si	0,28	2,15	2,44
10	Carbohidratos en la biomasa original					17	17
Biomasa: <i>Chaetoceros gracilis</i> (diez días de cultivo), con floculante (150 ppm FeCl3)							

*% Respecto a la biomasa seca

En la Tabla 6: se realizó un estudio de la degradación de la glucosa en presencia de NaOH, manteniendo constantes la concentración de metanol (50 % V/V) y tiempo de reacción (60 min). Se observó que a altas concentraciones de soda hay una degradación significativa de glucosa.

Tabla 6: Preliminares con glucosa variando la composición de soda

Ensayo	Condiciones pretratamiento				g. glucosa/ L de solución	% glucosa degradada
	Tiempo (min)	Metanol (%V/V)	Soda (%m/m)*	AQ (%m/m)*		
G1	60	50	25	No	0,70	95,17
G2	60	50	10	No	1,30	91,06
G3	60	50	5	No	1,66	88,57
G4	60	50	25	0,1	0,77	94,68
G5	60	50	10	0,1	0,82	94,31
G6	60	50	5	0,1	1,71	88,22
G7	60	50	1	0,1	4,45	69,29
G8	60	50	25	0,5	1,09	92,50
G9	60	50	10	0,5	1,11	92,32
HG10	Hidrólisis				3,28	4,71
Concentración inicial de glucosa para pretratamiento: 14,5 g de glucosa/ L de solución						
Concentración inicial de glucosa para hidrólisis: 3,448 g. de glucosa/ L de solución						

* % Respecto a la biomasa seca

Con los resultados obtenidos en las Tablas 5 y 6, se evidenció la degradación de los carbohidratos, por lo cual se decide realizar comparaciones con otros tipos de catalizadores, como fueron el ácido acético (CH_3COOH) y el hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), ácido y base débil, respectivamente. En la Tabla 7: se presenta los pretratamientos realizados con los dos catalizadores. Los resultados muestran que el ácido acético glacial obtiene mayor liberación de ART comparado con el pretratamiento con cal, sin embargo, hay más degradación de carbohidratos que en el experimento con soda. Para el pretratamiento con ácido acético cabe resaltar que durante el proceso hay formación de éste ácido, por lo que sería efectivo su uso; pero se descarta como catalizador porque es un inhibidor del proceso de fermentación [27].

Tabla 7: Pretratamiento e hidrólisis ácida a la microalga *Chaetoceros calcitrans* con diferentes catalizadores

Ensayo	Condiciones de Pretratamiento			%ART biomasa seca (g ART/100 g. biomasa seca)		
	Tiempo (min)	Metanol (% V/V)	Catalizador (% m/m)*	Pretratamiento	Hidrólisis	Totales
C1 (CH_3COOH)	60	50	1	0,86	2,42	3,29
C2 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)	60	50	1	0,52	2,67	3,19
C3 (NaOH)	60	50	1	0,53	3,13	3,66
S.P	Carbohidratos en la biomasa original				3,46	3,46
Biomasa: <i>Chaetoceros calcitrans</i> (3 días de cultivo)						

* % Respecto a la biomasa seca

3.3. Diseño central compuesto (DCC) del pretratamiento

Para encontrar las mejores condiciones de liberación de azúcares en la microalga se decide realizar un diseño central compuesto "DCC". Éste abarca mayor área de respuesta y busca regiones de máximos y mínimos.

Determinado un rango aproximado de las variables, se decide utilizar como catalizador el NaOH y realizar un diseño 2^3 central compuesto con 3 repeticiones en el punto central para la etapa de pretratamiento y la hidrólisis ácida se realizó a las condiciones estándar. La Tabla 8 presenta las condiciones de las variables escogidas de acuerdo a los resultados reportados en las Tablas 5 y 6, y los niveles sobre los que se va a trabajar.

Tabla 8: Factores y niveles del Pretratamiento

Factor	Unidades	Definición de niveles				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Porcentaje de NaOH	% m/m*	0,32	1	2	3	3,68
Porcentaje de Metanol	% V/V	1,36	15	35	55	68,64
Tiempo de cocción	min.	9,55	30	60	90	110,45
Variable de respuesta	% g. ART/100 g. de biomasa					

* % Respecto a la biomasa seca

La Tabla 9 muestra el DCC propuesto por STATISTICA 7.0 con % de ART obtenido en el pretratamiento y en la hidrólisis para cada ensayo.

De los resultados mostrados en la Tabla 9 se observa una relación directa metanol-soda. Los ensayos 3 y 7, mantienen constantes la concentración de metanol (55 % V/V) y tiempo de reacción (30 min); para estas condiciones hay mayor obtención de ART (0,19 % ART) a mayor concentración de soda (3 % m/m). Los ensayos 2 y 4, mantienen constantes la concentración de soda (1 % m/m) y el tiempo de reacción (90 min), obteniendo mayor cantidad de ART (0,21 % ART) para la menor concentración de metanol (15 % V/V). Entonces a mayor metanol, mayor soda y a menor metanol, menor soda.

Tabla 9: Matriz del diseño experimental central compuesto 2³ con respuesta de % ART obtenido en cada uno de los ensayos.

Corrida	Condiciones pretratamiento			% ART biomasa seca (g. ART/100 g. biomasa seca)		
	Soda (% m/m)*	Metanol (% V/V)	Tiempo (min)	Pretratamiento	Hidrólisis	Totales
1	1	15	30	0,22	2,55	2,77
2	1	15	90	0,21	1,66	1,87
3	1	55	30	0,09	2,42	2,51
4	1	55	90	0,13	1,91	2,04
5	3	15	30	0,09	2,19	2,28
6	3	15	90	0,22	2,9	3,12
7	3	55	30	0,19	2,69	2,88
8	3	55	90	0,11	2,45	2,56
9	0,32	35	60	0,27	2,56	2,83
10	3,68	35	60	0,2	1,43	1,63
11	2	1,36	60	0,06	2,29	2,35
12	2	68,64	60	0,21	1,8	2,01
13	2	35	9,55	0,09	2,04	2,13
14	2	35	110,45	0,19	2,17	2,36
15(C)	2	35	60	0,18	2,04	2,22
16(C)	2	35	60	0,13	2,27	2,4
17(C)	2	35	60	0,2	2,18	2,38
Sin Pretratamiento	No aplica				529	5,29
Biomasa Pretratada: <i>Chaetoceros gracilis</i> (3 días de cultivo)						

* % Respecto a la biomasa seca

En la Figura 4, se muestra el porcentaje de ART obtenidos en el pretratamiento. La mayor cantidad de ART para el pretratamiento se reporta para los ensayos 1, 2, 6, y 9 (0,22; 0,21; 0,22; 0,27 % ART; con rendimientos de 4,16; 3,96; 4,16 y 5,1 % respectivamente).

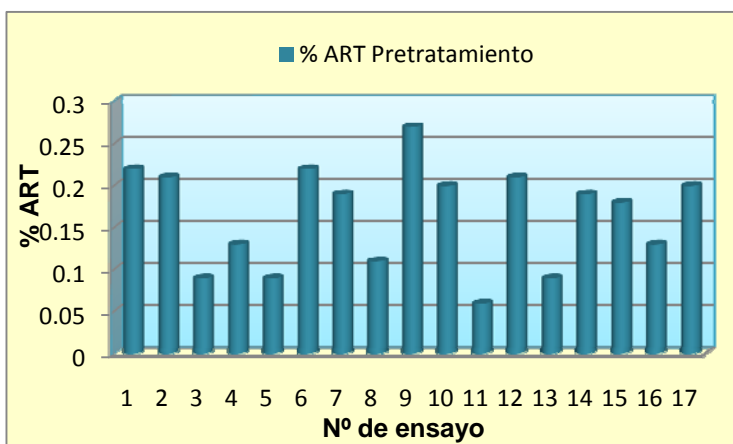


Figura 4. Porcentaje de ART obtenidos en el pretratamiento para el DCC.

En la Figura 5, se muestra la pérdida de biomasa para cada ensayo. Se observa que las pérdidas de biomasa son cercanas para los experimentos y no superan el 50%.

El ensayo 3 (NaOH: 1 [% m/m], metanol 50 [% V/V], tiempo 30[min]), es el que tiene mayor pérdida de biomasa, pero no se debe a la extracción de carbohidratos de la biomasa, sino a la degradación que las fuertes condiciones de metanol y soda le generan.

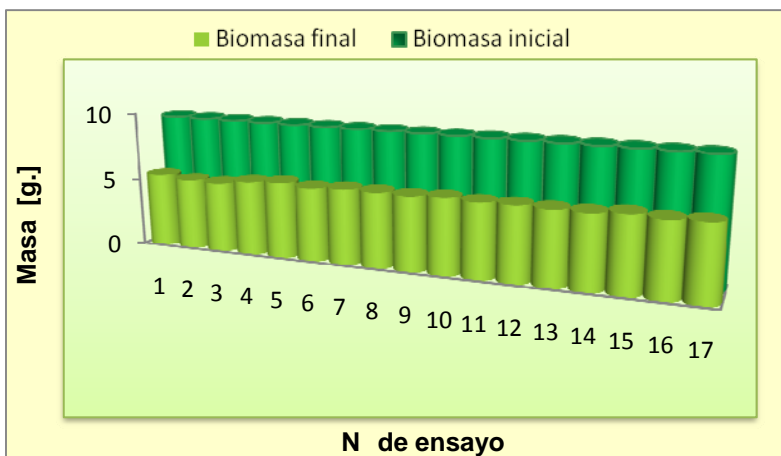


Figura 5. Pérdidas de biomasa en el pretratamiento

En la Figura 6, se muestra la pérdida de biomasa en la etapa de hidrólisis. Se reportan pérdidas de biomasa entre el 67 y el 78%. La mayor pérdida corresponde al ensayo 5 (78%).

De acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 9 podemos inferir que la etapa de hidrólisis es importante dentro del proceso, permitiendo la fácil cuantificación de los carbohidratos después de desordenar los enlaces de la pared celular de la microalga en el pretratamiento.

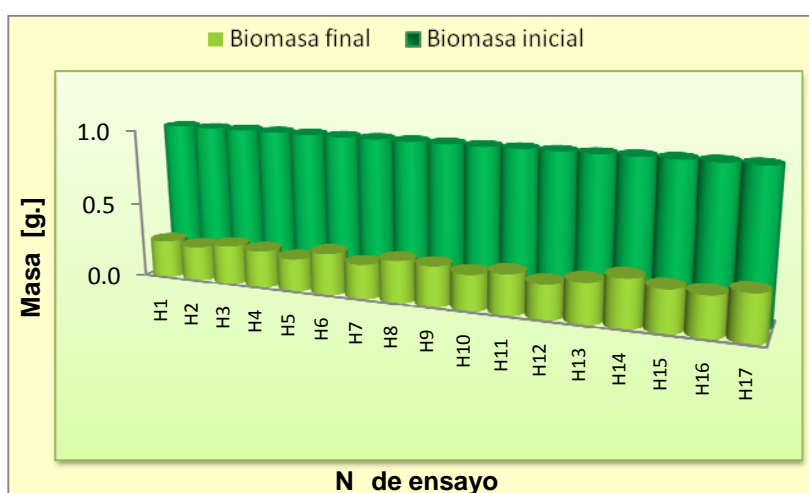


Figura 6. Pérdida de biomasa en la hidrólisis

3.3.1. Análisis de los efectos principales e interacción de las variables en el pretratamiento

La Tabla 10 muestra los efectos e interacciones para el diseño planteado mostrado por STATISTICA 7.0, donde se observa que no hay variables significativas.

Tabla 10: Efectos e interacciones arrojados por STATISTICA 7.0

Factor	Effect	Std. Err. Pure Err	t(2)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,170806	0,020776	8,22132	0,014475	0,110140	0,231471	0,170806	0,020776	0,110140	0,231471
(1)Catalizador(L)	-0,023098	0,019513	-1,18374	0,358145	-0,080076	0,033880	-0,011549	0,009757	-0,040038	0,016940
Catalizador(Q)	0,040412	0,021477	1,88163	0,200610	-0,022301	0,103124	0,020206	0,010739	-0,011150	0,051562
(2)Solvente(L)	0,004726	0,019513	0,24218	0,831210	-0,052252	0,061704	0,002363	0,009757	-0,026126	0,030852
Solvente(Q)	-0,030299	0,021477	-1,41076	0,293759	-0,093011	0,032414	-0,015149	0,010739	-0,046506	0,016207
(3)Tiempo (L)	0,036345	0,019513	1,86260	0,203558	-0,020633	0,093323	0,018173	0,009757	-0,010316	0,046661
Tiempo (Q)	-0,026763	0,021477	-1,24614	0,338885	-0,089476	0,036949	-0,013382	0,010739	-0,044738	0,017975
1L by 2L	0,050000	0,025495	1,96116	0,188893	-0,024445	0,124445	0,025000	0,012748	-0,012223	0,062223
1L by 3L	0,005000	0,025495	0,19612	0,862639	-0,069445	0,079445	0,002500	0,012748	-0,034723	0,039723
2L by 3L	-0,040000	0,025495	-1,56893	0,257219	-0,114445	0,034445	-0,020000	0,012748	-0,057223	0,017223

La Figura 7, muestra el diagrama de Pareto para el diseño central compuesto, donde se grafica las variables e interacciones contra los efectos estándar estimados, observándose que no hay variables significativa para el diseño ya que ninguna pasa p (0.1).

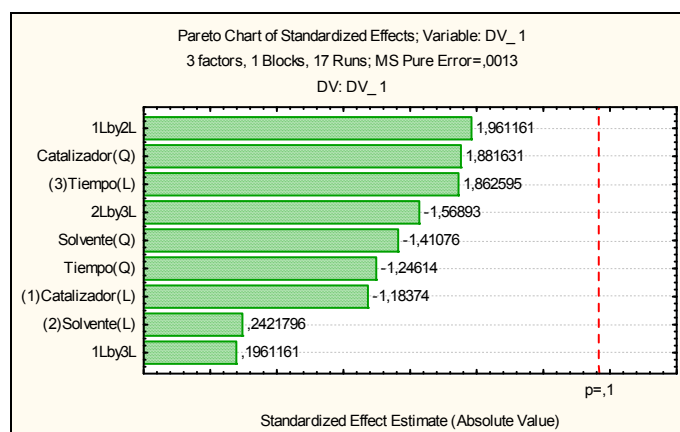


Figura 7. Diagrama de Pareto

A continuación se analizarán los efectos de las interacciones metanol-soda, soda-tiempo y metanol-tiempo; para encontrar las condiciones óptimas del pretratamiento.

3.3.1.1. Efecto de la interacción metanol-soda

La figura 8. Presenta la superficie de respuesta y curva de nivel para las variables de concentración de soda y metanol, manteniendo el un tiempo de 90 min. En la figura se observa que concentraciones bajas de metanol y soda favorecen la liberación de ART alcanzando producciones de 0,30 % de ART. Estos valores se mantienen para condiciones de tiempo altas (ANEXO G).

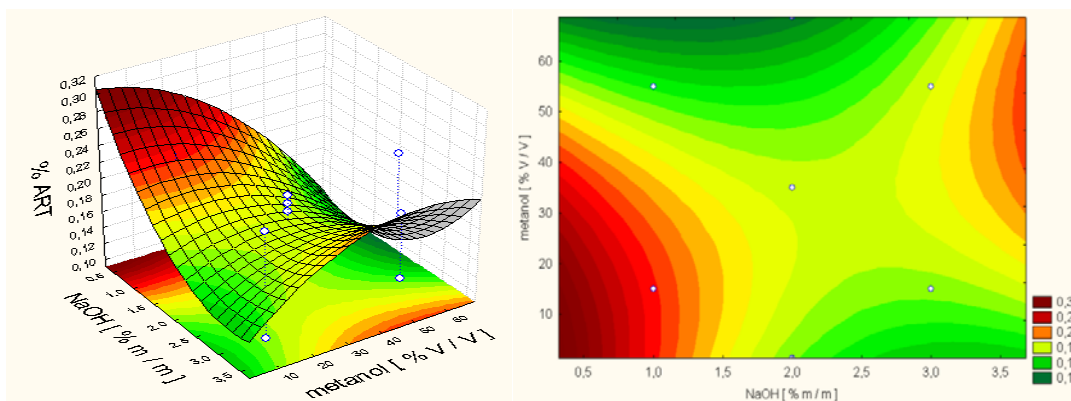


Figura 8. Superficie de respuesta (a) y curva de nivel (b), para tiempo de 90 min.

3.3.1.2. Efecto de la interacción soda-tiempo

En la Figura 9, se observa que para valores bajos de metanol, se requieren valores bajos de soda y tiempos altos. Se predice que para un valor de 1,36% V/V de metanol se obtiene un máximo de 0,31 % de ART (ANEXO G).

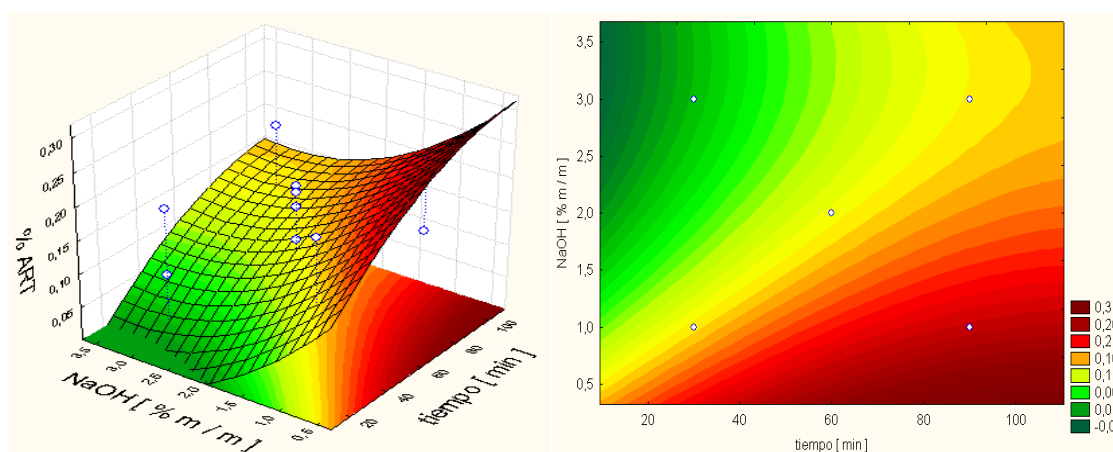


Figura 9. Superficie de respuesta (a) y curva de nivel (b), para un valor de metanol de 1,36 % V/V

3.3.1.3. Efecto de la interacción metanol-tiempo:

La Figura 10, muestra que para valores de soda de 0,32% m/m se hace necesario usar valores cercanos a cero de metanol y tiempo de reacción mayores de 60 min para obtener altos rendimientos de azúcares, hasta una predicción de 0,3 % de ART (ANEXO G)..

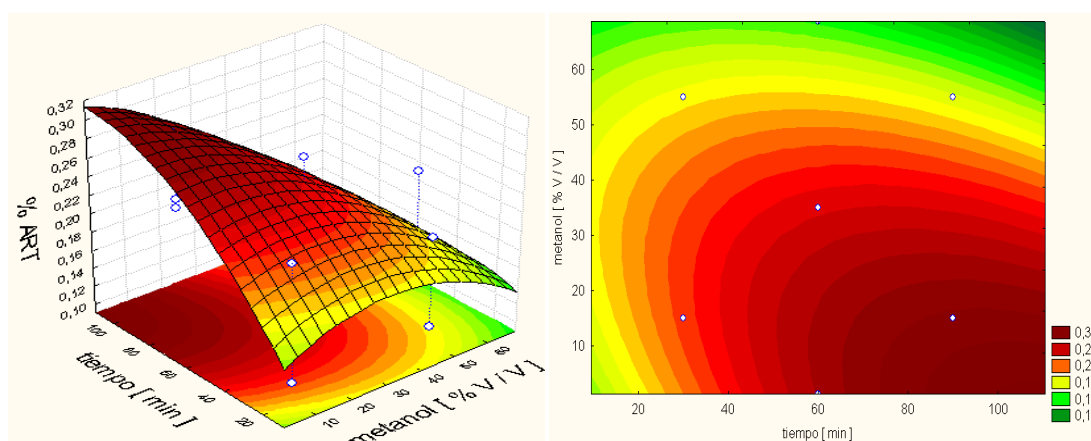


Figura 10. Superficie de respuesta (a) y curva de nivel (b), para una concentración de soda de 0,32 % V/V

3.4. Optimización del pretratamiento

Con la finalidad de encontrar la mayor liberación de ART en el pretratamiento, se trabaja en los puntos óptimos de las variables: % NaOH (X), % metanol (Y) y tiempo (Z). La Ecuación 3.3.1 es arrojada por el programa STATISTICA cuyos coeficientes se muestran en la Tabla 10.

$$\% ART = 0,170806 - 0,011549X + 0,020206X^2 + 0,002363Y - 0,014149Y^2 + 0,018173Z - 0,013382Z^2 + 0,025000XY + 0,0025000XZ - 0,020000YZ \quad (3.3.1)$$

Aplicando derivadas parciales a la Ecuación 3.3.1 e igualando a cero se tiene:

$$X = 0,354345; \quad Y = -0,196745; \quad Z = 0,85913$$

Dónde, c , b y M son variables reales, y m es una variable codificada. Para decodificar las variables se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{c-b}{1-0} = \frac{M-b}{m-0} \quad (3.3.2)$$

c , y b se muestran en la Tabla 11; M puede reemplazarse por X , Y o Z y m por x , y o z

Tabla 11: Niveles para reemplazar en la Ecuación 3.3.8

Variables	Niveles		
	A	b	C
% NaOH	1	2	3
% metanol	15	35	55
tiempo	30	60	90

$$\frac{3-2}{1-0} = \frac{x-2}{0,354345-0}, \quad x = 2,354345$$

$$\frac{55-35}{1-0} = \frac{y-35}{-0,196745-0}, \quad y = 31,0651$$

$$\frac{90-60}{1-0} = \frac{z-60}{0,85913-0}, \quad z = 85,7739$$

Las condiciones que predice el modelo cuadrático son: NaOH: 2,35 [% m/m], metanol: 31,06 [% V/V] y tiempo: 85,77 [min]. Con estas condiciones el modelo prevé una liberación de 0,17% de ART en el rango estudiado y para 90% de confianza.

Para la validación del modelo descrito en la ecuación 3.3.1 es necesario realizar el análisis de ANOVA mostrada en la Tabla 12. En la tabla referida se presenta un valor de coeficiente de determinación de 47 % indicando que el modelo explica este porcentaje en torno del promedio de producción de ART, siendo el 53 % restante explicado por los residuos.

Tabla 12: Análisis de varianza (ANOVA) para la producción de ART

Fuente de variación	Suma Cuadrática	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Test F
Regresión (R)	0,0275	9	0,0031	0,6930
residuo (r)	0,0309	7	0,0044	
falta de ajuste (faj)	0,0283	5	0,0056	4,3523
error puro (ep)	0,0026	2	0,0013	
Total (T)	0,0584	16		
% variación explicada (R ²)	47,1165			
Máxima variación explicada	95,5488			

A continuación son presentadas las condiciones que debe satisfacer la prueba F para la validación del modelo:

$$F_{(regresión\ calculado)} > F_{(regresión\ teórico)_{9,7}} = 0,6929 < 2,724$$

$$F_{(Falta\ ajuste\ calculado)} < F_{(Falta\ de\ ajuste\ teórico)_{5,2}} = 4,3523 < 9,2926$$

Al analizar los dos resultados de la prueba F obtenidos, se puede percibir que el valor por regresión no satisface la primera condición. Este resultado era de esperarse debido al bajo valor de R²=47,11% por lo cual un modelo cuadrático no describe la producción de azúcares en el pretratamiento en el rango estudiado. La segunda condición es aprobada, por lo que se comprueba el bajo error obtenido experimentalmente.

A pesar de no ser significativo el modelo las superficies de nivel describen tendencias de mayor producción de ART. Por lo cual se decide explorar las tendencias donde se observó mayor liberación de azúcar. Las tendencias del pretratamiento evidencian la necesidad de disminuir las concentraciones de metanol y soda. Por lo cual se decide disminuir las concentraciones de estas dos variables y compararlas con el valor obtenido con el modelo cuadrático.

Para los dos primeros ensayos se escogió un tiempo de 90 [min], condiciones mínimas de soda, en ausencia y con concentración mínima de metanol. Para el

tercer ensayo se tomó el punto crítico arrojado por STATISTICA 7.0, y para el cuarto ensayo, el punto crítico en ausencia de metanol.

En la Tabla 13, se muestran las condiciones usadas y los ART obtenidos para cada experimento.

Tabla 13: Ensayos de regiones de mayor liberación de ART

Ensayo	Condiciones			% ART biomasa seca (g ART/100 g. biomasa seca)		
	soda (% m/m)*	metanol (% V/V)	tiempo (min)	Pretratamiento	Hidrólisis	Totales
O1	0,32	1,36	90,00	0,86	2,55	3,41
O2	0,32	No	90,00	0,88	1,66	2,54
O3	2,35	31,06	85,77	0,30	2,42	2,72
O4	2,35	No	85,77	0,45	3,81	4,26
Sin Pretratamiento	No aplica				5,29	5,29
Biomasa Pretratada: <i>Chaetoceros gracilis</i> (3 días de cultivo)						

* % Respecto a la biomasa seca

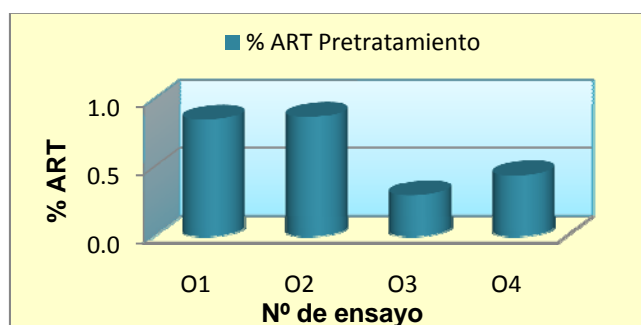


Figura 11. Porcentaje de ART obtenidos en el pretratamiento los ensayos con mayor liberación de ART.

Del análisis de los resultados obtenidos en el estudio del pretratamiento realizado con soda se deduce lo siguiente:

El contenido de ART más elevado corresponde al ensayo O2 (0,88 % ART y un rendimiento de 16,64 %) y el menor al O3 (0,30 % ART con 5,67 % de rendimiento). Pero, Cabe resaltar que se comprueba su eficiencia ya que en el residuo presenta mejor cantidad de carbohidratos. El rendimiento del proceso de obtención de carbohidratos en este ensayo fue 16,63%.

Al analizar los ensayos O1 y O2, podemos afirmar que el metanol tiene un efecto mínimo en el pretratamiento, considerando que éstos se realizaron a igual tiempo y concentración de soda (Figura 11).

Los resultados obtenidos de la Tabla 13, siguen mostrando una degradación de los carbohidratos, aunque en menor proporción que los mostrados en la Tabla 9. Las variables de operación mostradas por las condiciones O1, O2 y O4 son más convenientes que el punto crítico O3 proporcionado por el programa STATISTICA 7.0, pero aún así no se encontró el mejor pretratamiento, debido a la degradación de la glucosa por efecto de la soda.

En la Figura 12, se muestra la pérdida de biomasa para cada ensayo óptimo. Se observa que las pérdidas de biomasa son cercanas para los experimentos y no superan el 50%. El ensayo O1 (NaOH: 0,32 [% m/m], metanol: 1,36 [% V/V], Tiempo: 90[min.]), es el que tiene mayor pérdida de biomasa.

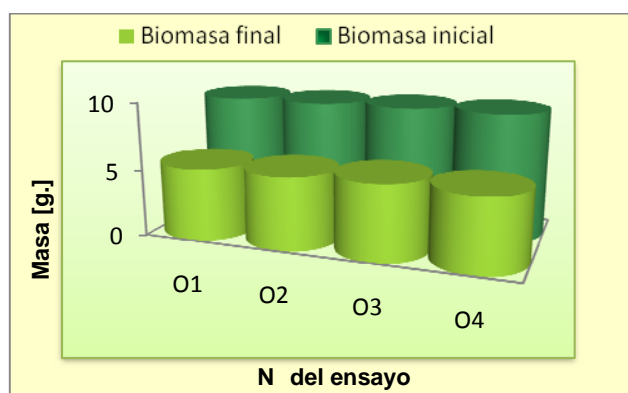


Figura 12. Pérdida de biomasa en el pretratamiento para los experimentos con mayor liberación de ART

Para la etapa de hidrólisis se reportan pérdidas de biomasa entre el 72 y el 78%. La mayor pérdida corresponde al ensayo O2. Evidenciándose una diferencia casi del 10% respecto a la hidrólisis a los ensayos del DCC.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un estudio del pretratamiento (metanol-base) de la microalga *Chaetoceros* sp. para la producción de azúcares reductores totales. Proceso innovador donde las condiciones del método Organosolv fueron ajustadas para biomásas de éste tipo.

El mejor resultado para el pretratamiento alcalino se obtuvo a las siguientes condiciones: Concentración de NaOH: 0,32 %, concentración de metanol: 0 %, tiempo de cocción: 90 min, temperatura: 121°C, con un rendimiento de 16,63 %; lo que indica que el metanol tiene un efecto mínimo en el proceso y que bajas concentraciones de NaOH influyen favorablemente en la obtención de los ART, sin embargo, se observa degradación por la adición de NaOH.

Al evaluar los cambios que el pretratamiento metanol-soda hace sobre *Chaetoceros gracilis*, se encontró que puede favorecer el desorden en la pared de la microalga para la obtención de la mayor cantidad de ART en la posterior hidrólisis. La hidrólisis representa una parte indispensable del proceso de obtención de ART.

Como el uso de metanol no representa una variable que mejore eficazmente el pretratamiento, se llega a la conclusión de evitar su uso y así no generar costos adicionales en su recuperación.

RECOMENDACIONES

Para futuros trabajos se podría realizar el pretratamiento con soda a microalgas con una pared celular más compleja, por ejemplo, la especie *Botryococcus braunii*, que es a su vez buena productora de lípidos y carbohidratos, pero su pared es más difícil de penetrar.

Para posteriores análisis se recomienda evaluar el efecto de variables de proceso como la temperatura y la relación licor/biomasa.

Se sugiere realizar una hidrólisis enzimática directa, debido a que se observa que la pared de la microalga es más débil que la de los materiales lignocelulósicos.

Es recomendable que para futuros trabajos con microalgas, no sólo se cuantifiquen los ART, sino que se haga un estudio de los carbohidratos presentes en la especie, la cantidad de celulosa y hemicelulosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Refutan tesis sobre baja rentabilidad del cultivo de microalgas para biocombustibles (Chile). Energías renovables, cultivos energéticos. Recuperado el 16 de enero de 2010 de: <http://www.biodisol.com/biocombustibles/refutan-tesis-sobre-baja-rentabilidad-del-cultivo-de-microalgas-para-biocombustibles-chile-energias-renovables-cultivos-energeticos/>
- [2] LÓPEZ, F.; et Al. Los alcoholes como solventes orgánicos para la obtención de pastas celulósicas. *Afinidad*. (Feb, 2006). pp.174-176.
- [3] SCHROETER, M. Possible lignin reactions in the organocell pulping process. *TAPPI Journal*. (Oct, 1991). pp. 197-200.
- [4] ROMANO, S; PEREIRA, N. Materias primas para la producción de biocombustibles líquidos. *Biocombustibles Líquidos en Iberoamerica*. Buenos Aires. Ediciones Cooperativas. 2009. pp. 11-13.
- [5] DOMÍNGUEZ, F; OTERO, A. Astaxantina, el oro rojo de la microalga *Haematococcus pluviales*. *Algas: boletín de la sociedad Española de Ficología*. (Jun, 2006). ISSN: 1695-8160. pp. 4-9.
- [6] QUINTANA, M; GONZÁLEZ. Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga *Chlorella sp*. *Rev. Cubana Aliment Nutr.* (1999).Vol. 13. pp. 9-13.
- [7] LORENZ, R; CYSEWKI, G. Commercial potencial for *Haenatococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin". *Trends in Biotechnology*. (2001). Vol. 8. pp. 160-167.

- [8] FABREGAS, J; et. al. Growth and biochemical variability of the microalga *Chlorella stigmatophora* in batch cultures with different salinities and nutrient gradient concentration. Br. Phycol. (1987). pp. 269-276.
- [9] BENEZRA, C. Extracción y cuantificación máxima de proteínas de la microalga marina, *Isochrysis sp.* Editorial Universidad de Sonora, división de ciencias biológicas y de la salud. (1995). Recuperado el 23 de enero de 2010 de: <http://www.biblioteca.uson.mx/digital/tesis/docs%5C1297%5CCapitulo2.pdf>.
- [10] MYKLESTAD, S; HAUG, A. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis var. Willei* (gran) Hustedt. Y. Effect of the concentration of Nutrients in the culture medium. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. (1972). Vol 9. pp 125-136.
- [11] WHYTE, N; NAGATA, W. Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, fed monospecific diets of yeast or phytoplankton. (1990).
- [12] FABREGAS, J; ABALDE, J. Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (buker) by nitrogen concentration as nitrate, nitrite and urea. Departamento de microbiología y parasitología. Facultad de farmacia. Universidad de Santiago, España. (1989). pp 223-239.
- [13] BUSTILLOS, C. Determinación de la composición química de tres especies de microalgas cultivadas en medios simplificados contra uno control f de Guillard y Ryther. Tesis. Centro de investigaciones científicas y tecnológicas de la Universidad de Sonora, México. (1992). pp. 3,4,6 y 19.
- [14] BROWN, M; JEFFERY, S; GARANCH, C. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture. CSIRO marine laboratories report 205, Division of fisheries. Australia. (1989).
- [15] TESHIMA, S; KANAZAWA, A; YAMASHITA, A. Dietary Value of several proteins and supplemental amino acids for larvae of the prawn *penaeus japonicus*. Aquaculture, 51:225-235. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. (1986).

- [16] VERA, G; TAM, J; PINTO, E; ANGULO, J. Efecto del cadmio sobre el crecimiento poblacional de la diatomea marina *Chaetoceros gracilis* schutt. Revista Peruana de Biología, ISSN versión electrónica: 1727-9933, Vol. 8, N° 1, 2001. Recuperado el 25 de noviembre de 2009 de:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v08_n1/efecto_cadmio.htm
- [17] OYUELA, E. Evaluación de la concentración y daño físico a *Chaetoceros gracilis* en la centrifugación”, Zamorano, Honduras. (Nov, 2005)
- [18] MALLO, J; FENUCCI, J. Alimentación de protozoas del langostino *Pleoticus muelleri* Bate utilizando diferentes microencapsulados y especies de microalgas”, Revista de Biología Marina y Oceanográfica. (Jul, 2004). vol. 39 N° 1. pp. 14.
- [19] OLIET, M. Estudio sobre la deslignificación de *Eucalyptus globulus* con etanol/agua como medio de cocción”. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid. (1999).
- [20] KLEINERT, T. Organosolv pulping with aqueous alcohol. TAPPI Journal. (1974). pp. 8, 57, 99-102.
- [21] QUINTERO, R. Uso de Biomasa: Hidrólisis paso fundamental. (2008).
- [22] VÁSQUEZ, E. Instituto de Química UNAM. Bioquímica y biología molecular en línea. Recuperado el 12 de diciembre de 2009 de:
<http://www.laguna.fmedic.unam.mx>.
- [23] PABON, I; 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. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. (2009).
- [24] GARZÓN, L. Optimización del pretratamiento con peróxido de Hidrógeno alcalino del bagazo de caña de azúcar para la producción de glucosa. Tesis de

pregrado. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. (2007).

[25] KUEHL, R. Diseño con superficie de respuesta. Diseño de experimentos. México. Thomson Editores. Segunda Edición.2001. pp. 423-447

[26] AITTAMAA, J.; SUNDQUIST, J. “Organosolv Pulping”, Department of Process Engineering, University of Oulu, FIN-90014CAMPOS, A. (2000)

[27] Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Tesis doctoral. Escola técnica superior d'Engynería agrària. Universitat de Lleida. (2001)

[28] PEREZ, S. Culturing algae. Recuperado el 12 de diciembre de 2009 de: <http://people.oregonstate.edu/~weisv/Protocols/Symbiodinium/Algal%20cultures.pdf>

[29] GUTIERREZ, M. Obtención y evaluación de pulpas soda-oxígeno a partir de bagazo de caña. Escuela de química. Universidad Industrial de Santander. (1998).

[30] MANIRAKIZA, P.; COVACI A.; SCHEPENS, P. 2001. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. Journal of Food Composition and Analysis 14:93–100.

ANEXOS

ANEXO A: REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Los reactivos, materiales y equipos que se muestran a continuación.

Tabla A1. Reactivos utilizados

Reactivo	Fórmula	Marca	Masa Molecular [g.mol ⁻¹]	Pureza [% en masa]
Ácido acético glacial	C ₂ H ₄ O ₂	Merck	60,05	99,7
Ácido di-nitro-3,5-salicílico	C ₇ H ₄ N ₂ O ₇	Merck	228,12	99
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	Merck	98,08	95-97
Agua destilada	H ₂ O	-	18	-
Antraquinona	C ₆ H ₄ COC ₆ H ₄ CO	Merck	208,22	98
Carbonato de Calcio	CaCO ₃	Merck	100,087	98-99
D-(+)-glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	Merck	180	100
Hexano	C ₆ H ₁₄	Mallinckrodt chemicals	86,18	98,5
Hidróxido de Calcio	Ca(OH) ₂	Merck	74,09	96
Hidróxido de Sodio	NaOH	Merck	39,98	100
Metanol	CH ₄ O	Merck	32,04	99,8
Tartrato de Sodio y Potasio Tetrahidratado	KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O	Merck	282,22	90

Tabla A2. Material utilizado

Cantidad	Nombre
43	Tubos de ensayo
16	Frascos resistentes a presión
2	Probetas de 100mL
2	Probetas de 500mL
1	Micropipeta de 200µL
1	Micropipeta de 1000µL
1	Micropipeta de 5mL
1	Balón aforado de 100mL
1	Balón aforado de 500mL
1	Varilla de agitación
	Vasos de precipitado
	Vidrios de reloj
	Papel filtro, Munktell

Tabla A3. Equipo utilizado

Equipo	Marca
Autoclave cilíndrica de 25 Litros	Mod 25-X
Balanza Análítica	Precisa Gravimetrics AG
Centrifuga de pie, modelo 5-25	M.L.W.
Bomba de inmersión serie 305335	Cole-Parmer
Espectrofotómetro	Pharo 300 Merck
Estufa con recirculación de aire WTC	Binder
Horno mufla modelo L-100	M.L.W.
Plancha de calentamiento modelo MSH-20D	Wisestir
pH metro	Schooh-Instruments GmbH
Rotoevaporador	Hahnshin scientific Co.

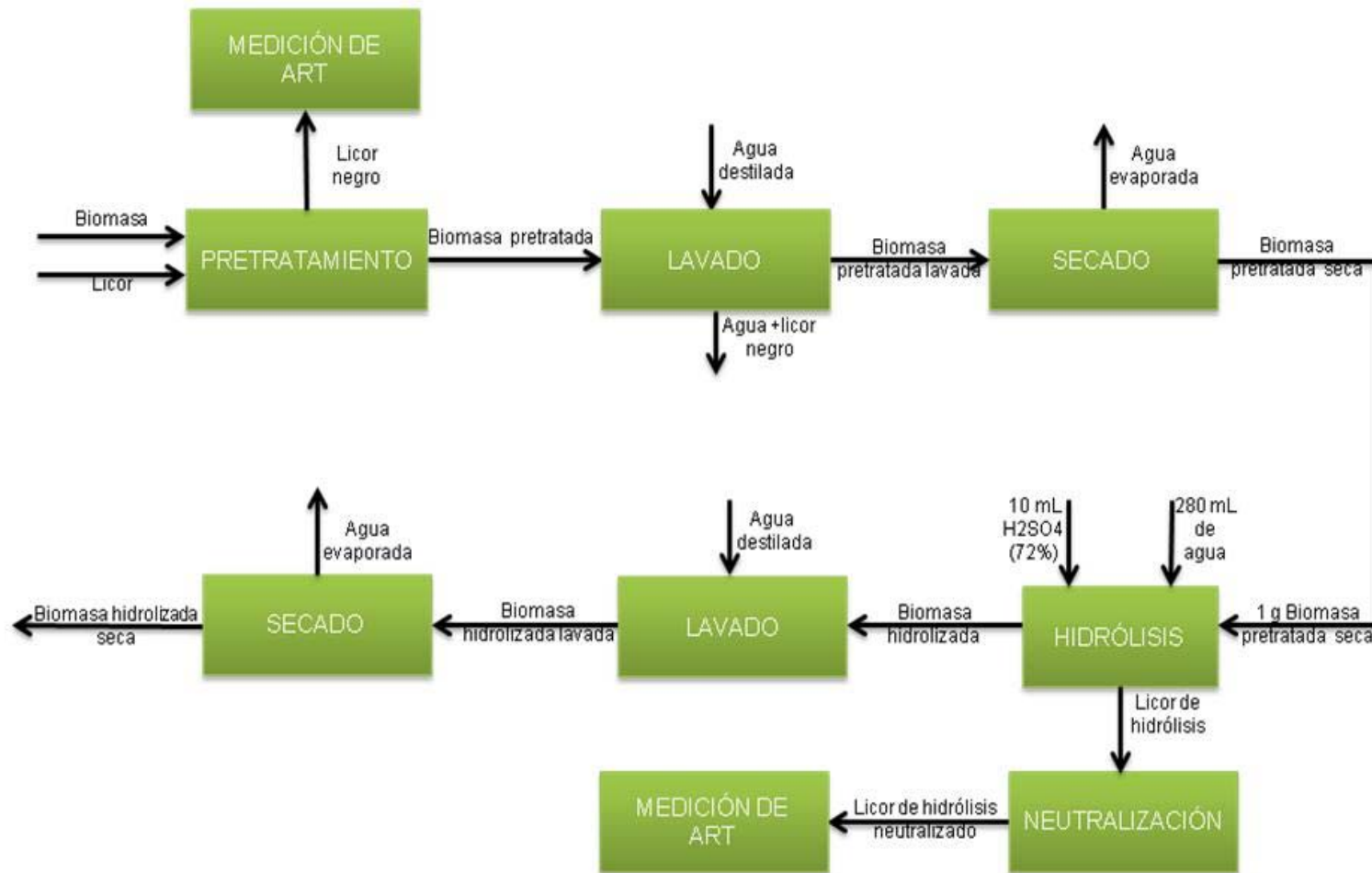


Figura A1. Diagrama esquemático del procedimiento experimental.

ANEXO B: MEDIO F/2

(Guillard y Ryther, 1962. Guillard 1975)

A 950 mL. de agua de mar adicionar los siguientes componentes [28]:

Tabla B1. Composición del medio f/2

Componente	Cantidad [mL]	Solución Stock [g./L DH ₂ O]	Concentración molar en el medio final [M]
NaNO ₃	1	75	8,83 x 10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1	5	3,63 x 10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O*	1	30	1,07 x 10 ⁻⁴
Solución de trazas metálicas	1	Mirar tabla B2	-----
Solución de vitaminas	0,5	Mirar tabla B3	-----

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 [28].

A 950 mL. de agua destilada adicionar los siguientes metales[28]:

Tabla B2. Composición de trazas metálicas para el medio f/2

Componente	Cantidad	Solución Stock [g./L DH ₂ O]	Concentración molar en el medio final [M]
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3,15 g.	-----	1,17 x 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	4,36 g.	-----	1,17 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 mL	9,8	9,10 x 10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1 mL	6,3	7,65 x 10 ⁻⁸
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1 mL	22	4,20 x 10 ⁻⁸
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1 mL	10	3,93 x 10 ⁻⁸
MnCl ₂ · 4H ₂ O	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[28]:

Tabla B3. Composición de vitaminas para el medio f/2

Componente	Cantidad	Solución Stock [g./L DH ₂ O]	Concentración molar en el medio final [M]
Vitamina B12*	1	1	1×10^{-10}
Biotina	10	0,1	2×10^{-9}
Tiamina * HCl	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 [28].

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) [28].

ANEXO C: CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

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

Tabla C1: Análisis efectuados sobre las muestras de *Chaetoceros gracilis* (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de $FeCl_3$, por El Instituto Colombiano de Petróleo (ICP)

Análisis	Resultado
%Humedad	13,3
%Cenizas	59,88
%Bulk, Roca total	NaCl, CaCl ₂
%Proteína	9,88
%Nitrógeno	1,52
%Silicio	4,64
%Hierro	43,07
%Calcio	0,7264
%Perdidas a 525 C-CL	37,75

Tabla C2: Análisis efectuados sobre las muestras de *Chaetoceros gracilis* (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de $FeCl_3$, por La Universidad de Antioquia (UDEA)

Análisis	Resultado
%Humedad	11,53
%Cenizas	61,74
%Carbohidratos	17,27
%Proteína	9,39
%Nitrógeno	1,502
%Grasa	0,061
%Calorías	107,2
%Fibra bruta	0,18

Tabla C3: Análisis efectuados sobre las muestras de *Chaetoceros gracilis* (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de $FeCl_3$, en el laboratorio

Análisis	Resultado
%Humedad	14,85
%Cenizas	44,92
% Lípidos	1,23
% carbohidratos	17

Tabla C4: Análisis efectuados sobre las muestras de *Chaetoceros calcitrans* (tres días de cultivo) floculada con 30 ppm de $FeCl_3$, en el laboratorio

Análisis	Resultado
%Humedad	8,46
%Cenizas	45,65
% Lípidos	3,24
% carbohidratos	6,47

Tabla C5: Análisis efectuados sobre las muestras de *Chaetoceros gracilis* (tres días de cultivo) floculada con 30 ppm de $FeCl_3$, en el laboratorio

Análisis	Resultado
%Humedad	5,66
%Cenizas	58,83
% Lípidos	2,38
% carbohidratos	5,29

ANEXO D: ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA

D.1. CONTENIDO DE HUMEDAD (NREL/TP-510-42621)

Determinación importante para el cálculo de otras propiedades referidas a la materia prima seca, que es la base sobre la cual se comparan las muestras a lo largo del procedimiento.

Se pesó una muestra representativa (2g.) de biomasa en un crisol previamente tarado y se secó en una estufa BINDER a 105°C por 12 horas. Luego se dejó enfriar en un desecador y se pesó. Este procedimiento se realizó por quintuplicado. La humedad se calculó de la siguiente forma:

$$\%Humedad = \frac{(Peso\ húmedo - Peso\ seco)}{Peso\ húmedo} * 100 \quad (\mathbf{D.1.1})$$

D.2. CONTENIDO DE CENIZAS LAP005 (NREL/TP-510-42622)

Indica la cantidad de sales minerales presentes en la materia prima. Cuando el contenido de cenizas es elevado, los digestores presentan problemas de corrosión y en los sistemas de recuperación de reactivos hay incrustaciones [29].

Se pesó 2 g. de muestra representativa de biomasa en un crisol previamente tarado y se secó en una estufa BINDER a 105°C por 24 horas, luego, se pusieron en la mufla M.L.W. a 575 ± 25 °C por 8 horas. Pasado éste tiempo se apagó la mufla y se dejó enfriar hasta 100°C. Se sacó el crisol, se mantuvo en el desecador y se pesó. Esta determinación se realizó para todas las muestras. El porcentaje de cenizas se calculó de la siguiente forma:

$$\% cenizas = \frac{Peso\ del\ residuo * 100}{Peso\ seco\ de\ la\ muestra} \quad (\mathbf{D.2.1})$$

D.3. CONTENIDO DE LÍPIDOS LAP010 (NREL/TP-510-42619)

El sistema de extracción soxhlet ha sido ampliamente utilizado en la extracción de aceite de microalgas [30].

Se pesó 10 g. de biomasa que se envolvieron en un papel filtro previamente seco y pesado. Se agregó 100 mL. de hexano a un balón. Se colocó la muestra en el tubo de extracción soxhlet que comunica con un condensador. Después de evaporarse, el solvente orgánico se condensó y cayó al tubo Soxhlet, al llenarse este sifonó hasta el balón que contenía el resto de solvente y el proceso se repitió. Pasadas cuatro horas se desmontó y se colocó en la estufa BINDER a 105°C por 12 horas. El porcentaje de lípidos se calculó de la siguiente forma:

$$\%Lípidos = \frac{Peso\ inicial - Peso\ final}{Peso\ inicial} * 100 \quad (D.3.1)$$

D.4. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES LAP007 (NREL/TP-510-42618)

Se realizó en dos pasos:

1. Una pre-hidrólisis, en la que se pesó 1 g. de biomasa al que posteriormente se le agregó 10 mL. de H₂SO₄ al 72% en un tubo de ensayo que se mantiene en un baño con agua a 30°C por 1 hora agitando cada 10 min.
2. Una hidrólisis, en la que se agregó 280 mL. de agua destilada en un erlenmeyer con la mezcla de la pre-hidrólisis, se sometieron a autoclavado por 1 hora a 121°C.

Pasada la hora, se desmontó, se separó la biomasa del licor; la biomasa se lavó muy bien con agua destilada y se llevó a una estufa BINDER a 105°C por 12 horas. Para la cuantificación de los carbohidratos en el licor se utilizó el método DNS.

ANEXO E: 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 el pretratamiento y en la hidrólisis, 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. Éstos 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, se tomó un vaso de precipitado forrado con papel aluminio, en el cual se calentó 400 mL de agua destilada a 50°C (Temperatura constante para toda la preparación) y se adicionó lentamente 10 g. de DNS. Adicionalmente se preparó una solución básica con 16 g. de NaOH Y 200 mL de agua destilada. La solución básica se adicionó al vaso de precipitado con la solución de DNS. Luego, se adicionó 300 g. de Tartrato de Sodio y Potasio. Se esperó hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se aforó hasta 1000 mL Se dejó reposar y se almacenó en un frasco ámbar.

Curva de calibración

La curva de calibración se realizó con glucosa. Se hicieron dos curvas de calibración, debido a un cambio en el DNS utilizado.

Se preparó 10 mL de solución de glucosa con una concentración de 1 mg/mL para las dos curvas.

Se preparó de la soluciones existentes de glucosa (1mg/mL), soluciones de glucosa de 0 a 1 mg/mL, con intervalos de 0,1 mg.mL. a cada tubo se adicionó 0,5 mL del reactivo DNS, se agitaron manualmente y fueron puestos en un baño maría (100 °C) durante 5 min. Los tubos fueron transferidos rápidamente a un baño de hielo (4 °C) para detener la reacción, una vez enfriada la solución, se adicionó a cada tubo 5 mL de agua destilada. Se dejaron en reposo durante 15 min, y posteriormente fueron leídas en el espectrofotómetro, obteniendo las absorbancias para cada concentración de glucosa. La primera curva de calibración se observa en la Figura E1 y la segunda en la Figura E2.

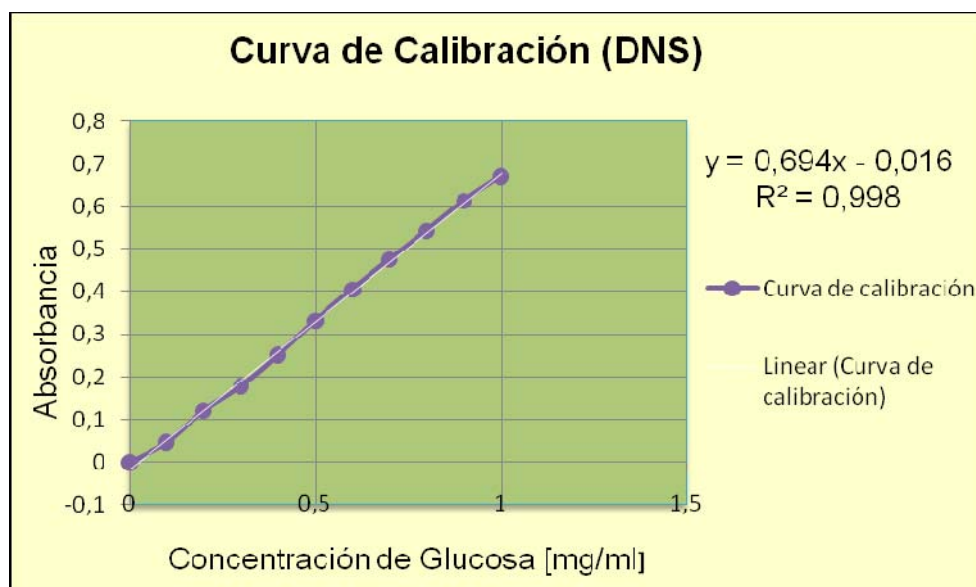


Figura E1. Primera curva de glucosa.

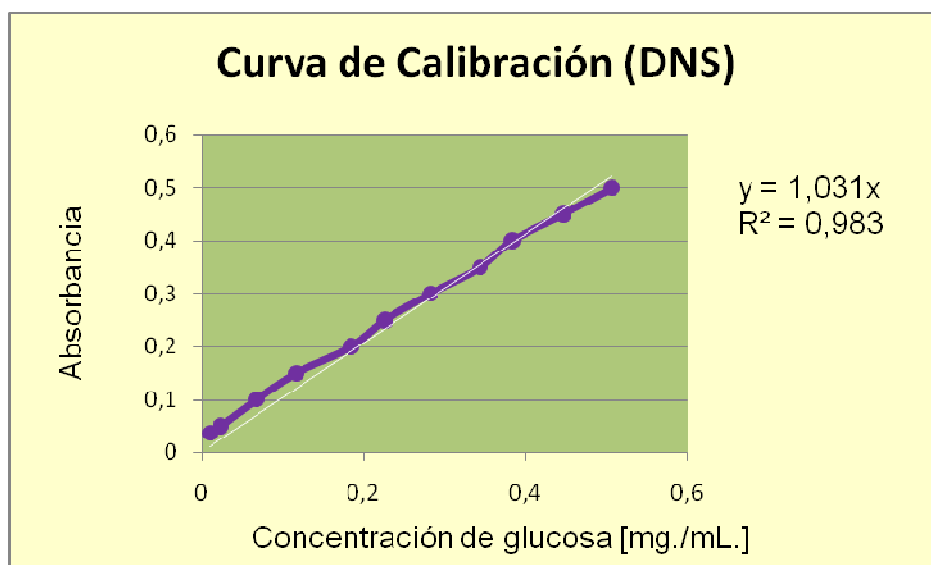


Figura E2. Segunda curva de glucosa.

Preparación de las muestras del licor de pretratamiento y del licor de hidrólisis para la determinación de azúcares reductores.

Se tomó 0,5 mL de muestra en un tubo de ensayo (licor de pretratamiento y licor de hidrólisis). Para las muestras del licor de hidrólisis se ajusta el Ph entre 5 y 6, con CaCO_3 . A cada tubo de ensayo con la muestra, se adicionó 0,5 mL de reactivo DNS, se agitaron manualmente y fueron colocados en baño maría (100°C) durante 5 min. Los tubos fueron transferidos rápidamente a baño de hielo (4°C) y se adicionaron 5 mL de agua destilada. La absorbancia fue medida a 540 nm y la concentración de la muestras fue determinada por la ecuación de la recta. Las muestras se prepararon por triplicado y usando un blanco de agua destilada.

ANEXO F: ILUSTRACIONES LAS PRINCIPALES ETAPAS DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL REALIZADO EN EL LABORATORIO

F1. PRETRATAMIENTO



Figura F1. Etapa de pretratamiento

F2. HIDRÓLISIS

- Pre-hidrólisis



Figura F2. Pre-hidrólisis de la biomasa pretratada y/o sin pretratar

- **Hidrólisis**



Figura F3. Hidrólisis de la biomasa pretratada pretratada y/o sin pretratar

F3. MEDICIÓN DEL DNS



Figura F4. Cuantificación de los ART a los licores de pretratamiento e hidrólisis

F4. FILTRACIÓN



Figura F5. Filtración a vacío para la etapa de pretratamiento y la etapa de hidrólisis

F6. SECADO

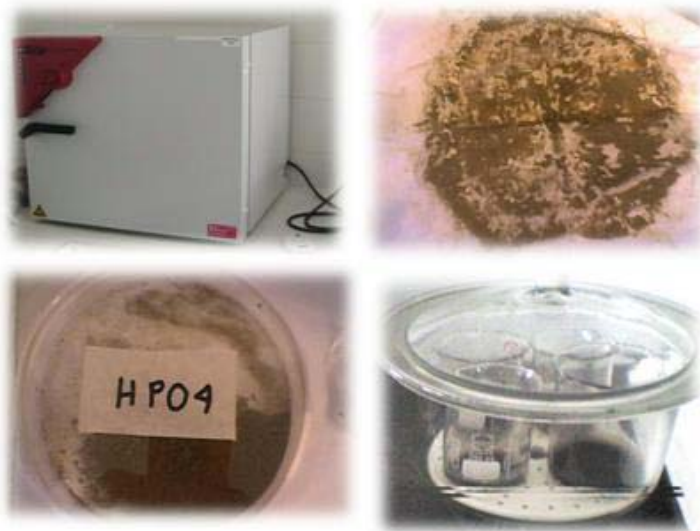


Figura F6. Secado para las etapas de pretratamiento e hidrólisis

ANEXO G: SUPERFICIES DE RESPUESTA ARROJADAS POR STATISTICA 7.0.

En las figuras G1, G2, G3 y G4, se muestran las superficies de respuesta para los tiempos de reacción planteados en el DCC.

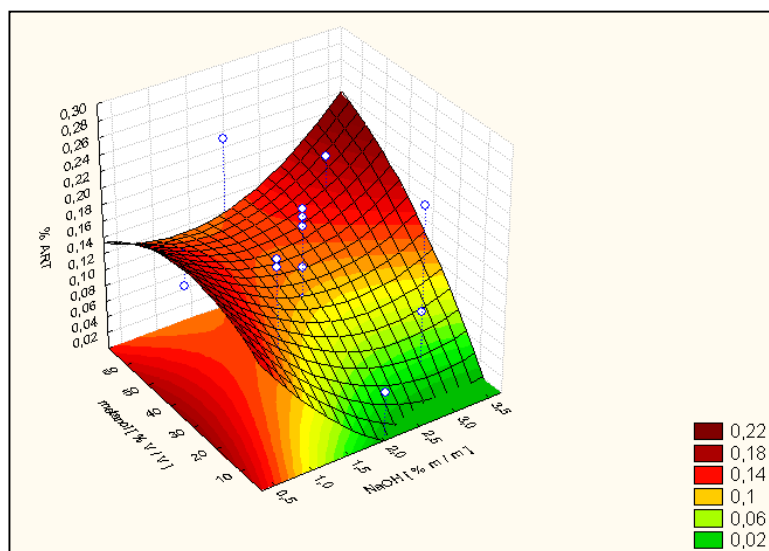


Figura G1. Superficie de respuesta para $t=9,55$ min.

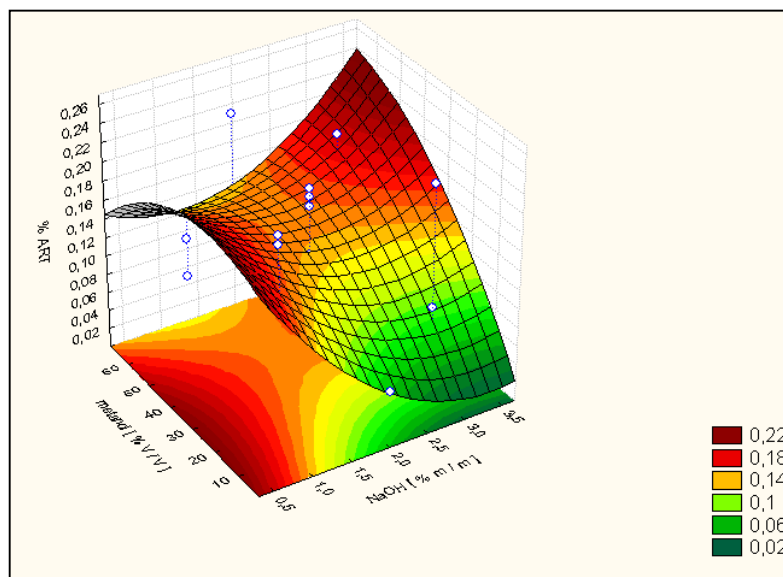


Figura G2. Superficie de respuesta para $t=30$ min.

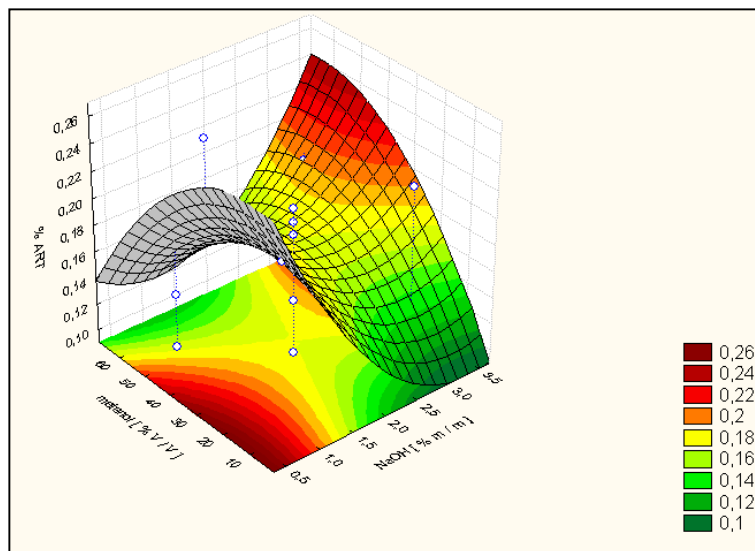


Figura G3. Superficie de respuesta para t= 60 min.

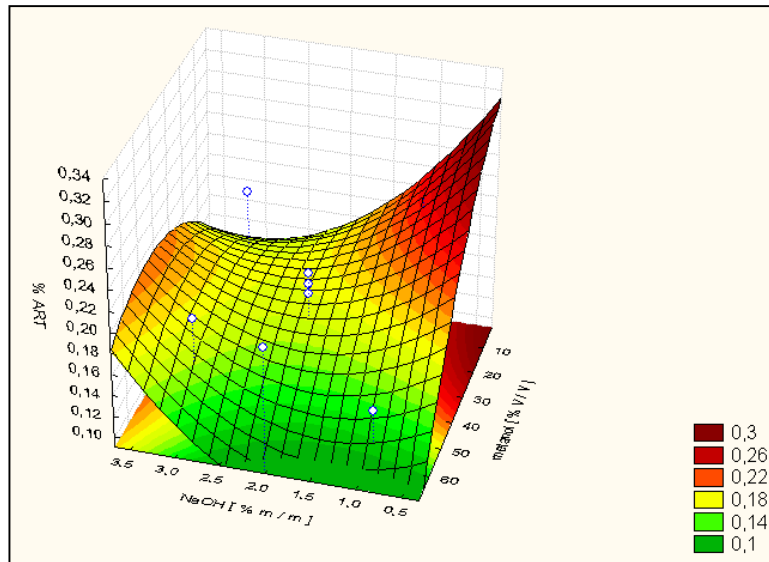


Figura G4. Superficie de respuesta para t=110.45 min.

En las figuras G5, G6, G7 y F8, se muestran las superficies de respuesta para las concentraciones de NaOH planteadas en el DCC.

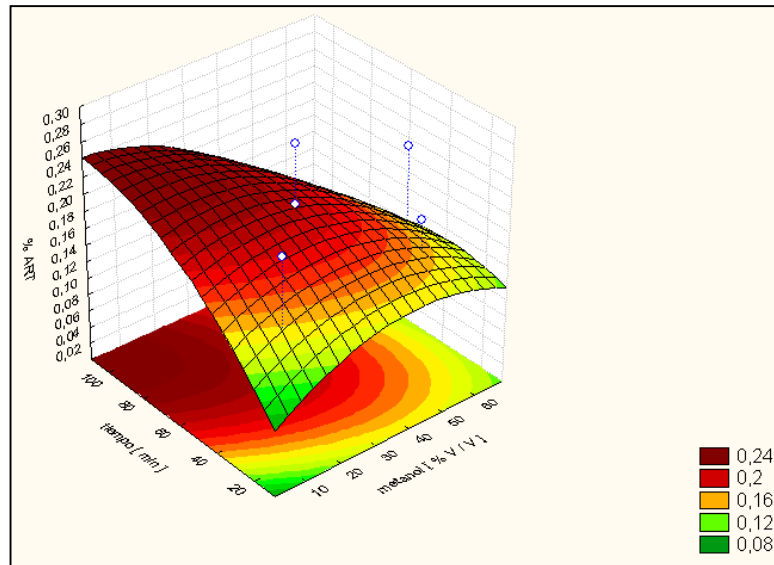


Figura G5. Superficie de respuesta para NaOH=1% m/m.

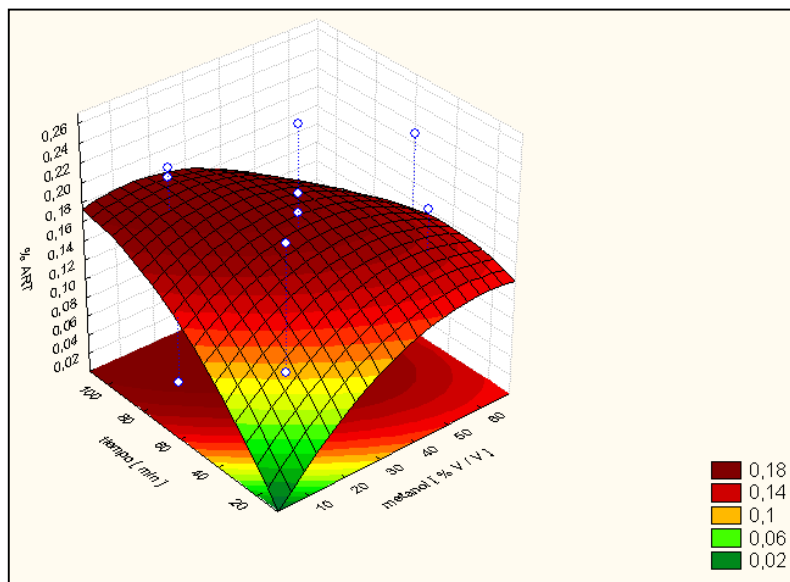


Figura G6. Superficie de respuesta para NaOH=2 % m/m.

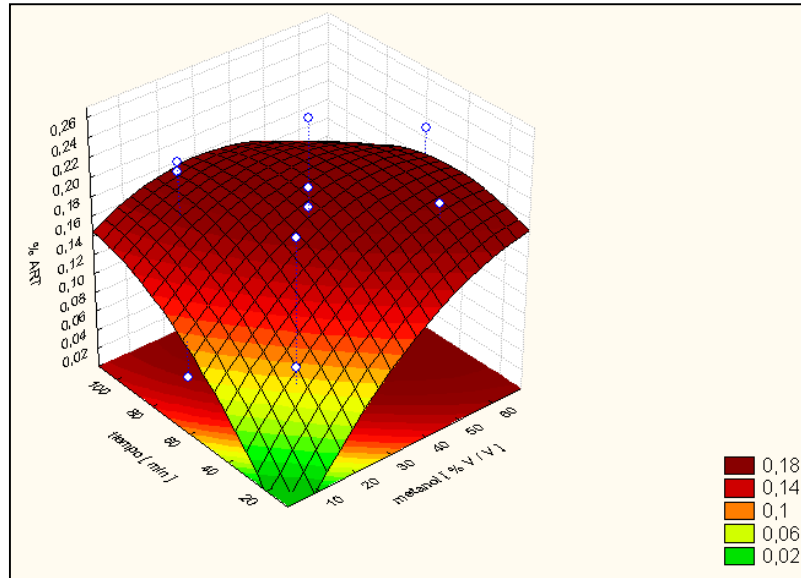


Figura G7. Superficie de respuesta para NaOH=3 % m/m.

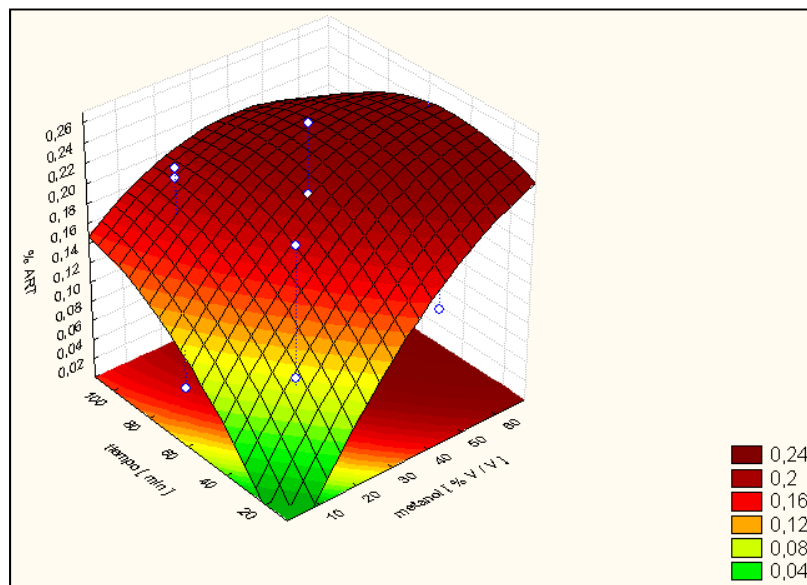


Figura G8. Superficie de respuesta para NaOH=3,68 % m/m.

En las figuras G9, G10, G11 y G12, se muestran las superficies de respuesta para las concentraciones de metanol planteadas en el DCC.

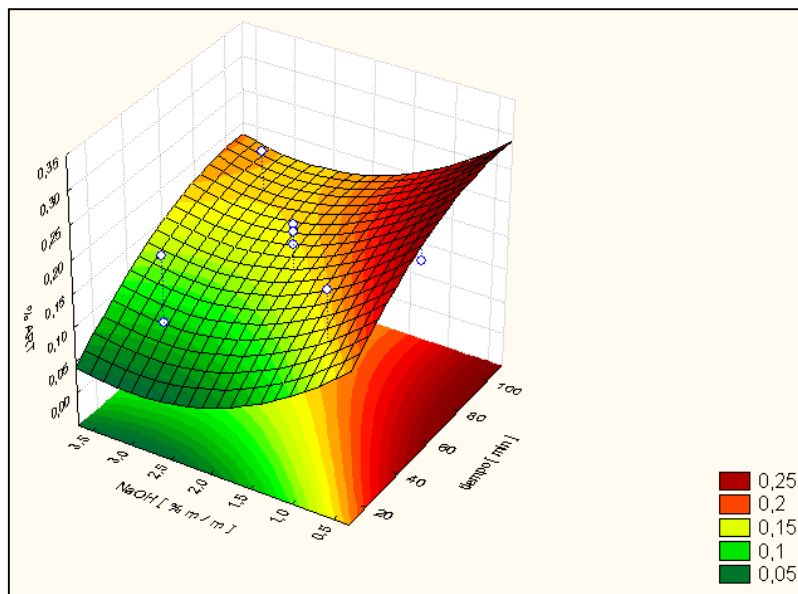


Figura G9. Superficie de respuesta para metanol=15 % V/V.

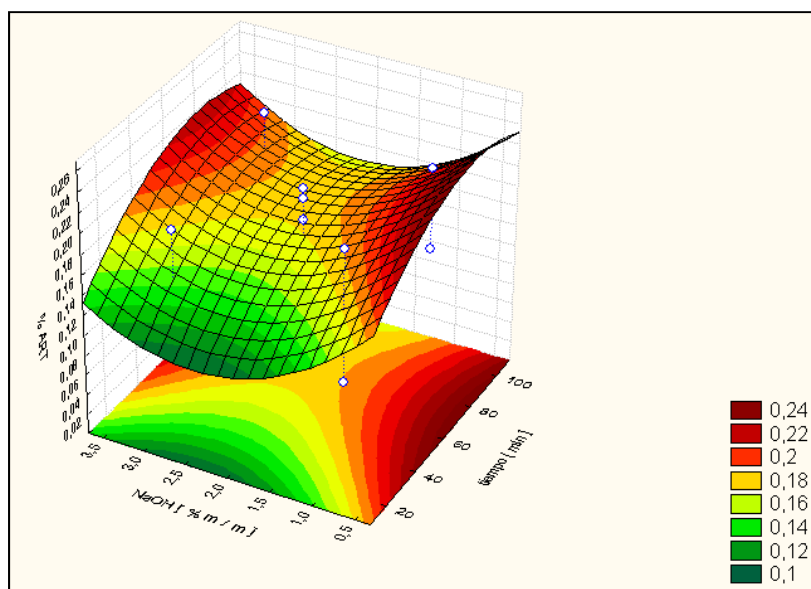


Figura G10. Superficie de respuesta para metanol=35 % V/V.

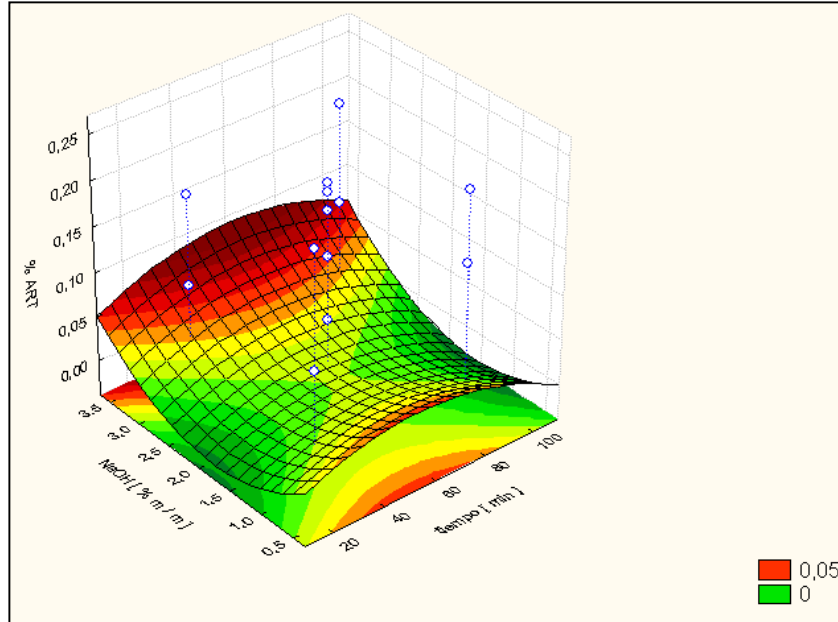


Figura G11. Superficie de respuesta para metanol=55 %V/V.

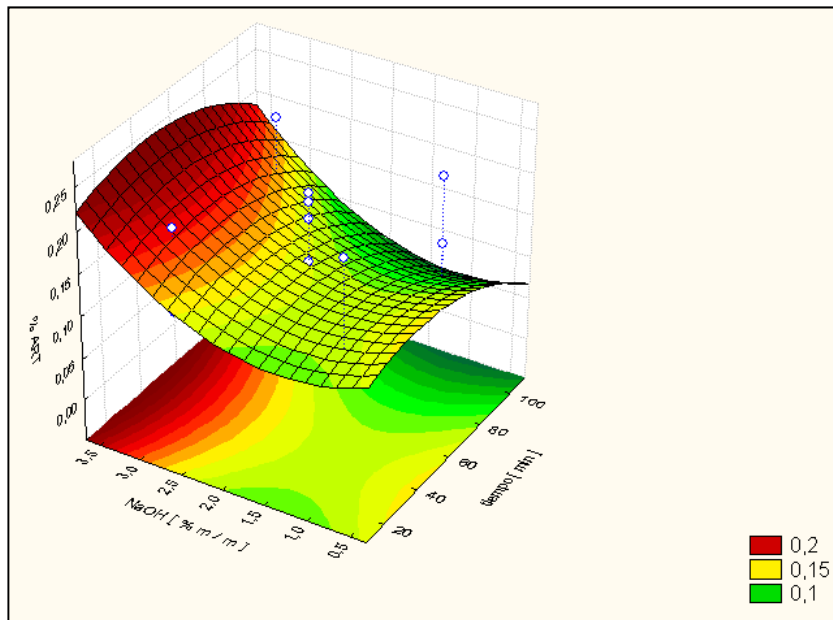


Figura G12. Superficie de respuesta para metanol=68,64 % V/V.