

**ESTUDIO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DISRUPCIÓN
CELULAR/EXTRACCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE DE
MICROALGAS DE BIOPROSPECCIÓN NACIONAL A ESCALA LABORATORIO**

DIANA PAOLA ÁLVAREZ SUÁREZ

DIANA CATALINA MOLANO BAYONA

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

2011

**ESTUDIO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DISRUPCIÓN
CELULAR/EXTRACCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE DE
MICROALGAS DE BIOPROSPECCIÓN NACIONAL A ESCALA LABORATORIO**

DIANA PAOLA ÁLVAREZ SUÁREZ

DIANA CATALINA MOLANO BAYONA

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

Director:

VIATCHESLAV KAFAROV

Dr. Ingeniero Químico

Codirector:

ÁNGEL DARIO GONZÁLEZ

Ingeniero Químico

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

2011

DEDICATORIA

Porque ha guiado mi vida llevándola de alegrías y logros como este, a Dios, mil gracias.

*A mi mamá Gloria Suárez porque su confianza y amor me alienta cada día y a mi papá
Eduardo Álvarez quien me apoya y cree en mi.*

Adriana Álvarez, mi querido polo opuesto, quien me enseña de cine, filosofía y literatura.

A Daniel Felipe, a quien adoro! Es mi motivo para luchar.

*Yeni Lion, Fer, Anita Y Jairito Andrés; adoro cada uno de los momentos compartidos. Su
presencia ha sido una bendición y su incondicionalidad, fundamental en la consecución de
este logro.*

*Astrili, cuántas vivencias!! Dios no pudo darme una amiga mejor. Este es un triunfo de
las dos.*

*A César Villalobos por aparecer en mi vida en el momento preciso para fortalecerme y
llenarme de amor.*

DIANA ÁLVAREZ.

DEDICATORIA

A Dios por ser mi quía y mi motivo.

*A mi mami Amelia Bayona porque con su trabajo y dedicación ha hecho posible y
a mi papa Alejandro Molano por su cariño y enseñanzas.*

*A Lina quien me ha orientado y es un ejemplo a seguir y a Diego que me inspira y
me anima a ser mejor.*

A Oscar por apoyarme y estar para mí siempre que lo necesite.

A mis abuelitas, tías y tíos que siempre estuvieron pendientes de mí.

A Ricardo Nieto, un amigo y compañero.

A mis amigos y demás familiares que me han dado tantos momentos valiosos.

Cata

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos 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 e información brindada.

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

Dr. Sc. ViatcheslavKafarov por su aporte y colaboración.

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.

Al comité científico del 6^{to} congreso sobre el desarrollo sostenible de energía, agua y sistemas ambientales en Croacia por aceptar este trabajo como ponencia en sección especial.

Al comité organizador del 6^{to} congreso colombiano de botánica en Cali por aceptar este trabajo en modalidad cartel.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO TEÓRICO	17
1.1 GENERALIDADES DE MICROALGAS.....	17
1.1.1 <i>Guinardia</i> sp. H Peragallo, 1892	17
1.1.2 <i>Tetraedron</i> sp. Kützing, 1845	17
1.1.3 <i>Amphiprora</i> sp. Ehrenberg, 1843.....	18
1.2 OBTENCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS.....	18
1.2.2 Métodos de extracción.....	18
1.2.2.1 Etanol-Hexano	19
1.2.2.2 Cloroformo-Metanol	19
1.2.2.3 Soxhlet con hexano	19
1.2.2.4 Extracción in-situ	19
2. DISEÑO METODOLÓGICO.....	21
2.1 MATERIALES.....	21
2.1.1 Materia prima	22
2.1.2 Reactivos	22
2.2 EQUIPOS	22
2.3 PROCEDIMIENTO	23
2.3.1 Disrupción celular	23
2.3.2 Métodos de extracción.....	23

2.3.2.1	Etanol hexano	24
2.3.2.2	Cloroformo metanol:	25
2.3.2.3	Soxhlet	25
2.3.2.4	Extracción in situ	26
2.3.3	Cuantificación del extracto	27
2.4	ESTUDIOS COMPARATIVOS	27
2.4.1	Respuesta morfológica	28
2.4.2	Análisis ANOVA y prueba de múltiples rangos	28
2.4.3	Casos de estudio	29
2.4.3.1	Estudio de requerimientos energéticos	30
2.4.3.2	Estudio de costos	31
2.4.3.3	Toxicidad	31
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	33
3.1	DISRUPCIÓN CELULAR	33
3.2	RESPUESTA MORFOLÓGICA.....	34
3.3	COMPARACIÓN DE EFICIENCIAS DE EXTRACCIÓN.	36
3.3.1	Análisis ANOVA y pruebas de múltiples rangos	37
3.4	CASOS DE ESTUDIO.....	41
4.	CONCLUSIONES	46
5.	RECOMENDACIONES.....	47
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies usadas y sus porcentajes lipídicos.....	22
Tabla 2. Potencia nominal de los equipos usados	30
Tabla 3. Costo de los reactivos	31
Tabla 4. Criterio de toxicidad de los reactivos.....	32
Tabla 5. Eficiencias obtenidas experimentalmente	36
Tabla 6. Energía, costo y toxicidad de los métodos empleados	41
Tabla 7. Estudio de escenarios	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metodología experimental	21
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de disrupción celular	23
Figura 3. Diagrama flujo del método etanol-hexano	24
Figura 4. Diagrama de flujo del método cloroformo metanol	25
Figura 5. Diagrama de flujo del método soxhlet	26
Figura 6. Diagrama de flujo del método in-situ	26
Figura 7. Metodología de comparación de los métodos	29
Figura 8. Rendimiento en el proceso de disrupción celular	33
Figura 9. Imágenes de microscopía <i>Guinardia</i> sp.	34
Figura 10. Imágenes de microscopía <i>Tetraedron</i> sp.	35
Figura 11. Imágenes de microscopia <i>Amphiprora</i> sp.	36
Figura 12. Gráfico de medias y prueba de múltiples rangos, <i>Guinardia</i> sp.	37
Figura 13. Soxhlet vs metanol cloroformo, <i>Guinardia</i> sp.	38
Figura 14. Gráfico de medias y prueba de múltiples rangos, <i>Tetraedron</i> sp.	39
Figura 15. Soxhlet vs metanol cloroformo, <i>Tetraedron</i> sp.	39
Figura 16. Gráfico de medias y prueba de múltiples rangos, <i>Amphiprora</i> sp.	40
Figura 17. Soxhlet vs. metanol cloroformo, <i>Amphiprora</i> sp.	41
Figura 18. Favorabilidad de los métodos en <i>Guinardia</i> sp.	43
Figura 19. Favorabilidad de los métodos en <i>Amphiprora</i> sp.	44
Figura 20. Favorabilidad de los métodos en <i>Tetraedron</i> sp.	45

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DISRUPCIÓN CELULAR/EXTRACCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS DE BIOPROSPECCIÓN NACIONAL*.

AUTORES: DIANA CATALINA MOLANO BAYONA, DIANA PAOLA ÁLVAREZ SUÁREZ**.

PALABRAS CLAVE: Microalgas, disrupción celular, extracción, lípidos.

La obtención de biodiesel a partir de microalgas es promisorio al tener el potencial de proporcionar grandes cantidades de combustible a partir de pequeñas áreas de cultivo y menores costos de producción. Una etapa importante en esta cadena de producción es la extracción del aceite de microalgas cuya eficiencia está relacionada con la eficiencia global del proceso

El tema de este estudio es la comparación en términos de eficiencia, costo, requerimientos energéticos y toxicidad; de 5 métodos de extracción de aceite de microalgas con solventes químicos acompañados de disrupción celular. Se empleó hidrólisis con HCl 0.5M como método de disrupción celular para soxhlet con hexano, Etanol/hexano y métodos in-situ con hexano y ciclohexano y se realizó el método Metanol/Cloroformo a partir de biomasa sin pretratar, todo esto para 3 cepas bioprospectadas, aisladas y escaladas pertenecientes a los géneros *Guinardia* sp., *Tetraedron* sp. y *Amphiprora* sp. Se desarrollaron dos estudios con el propósito de determinar el mejor de estos procedimientos. El primero, un análisis estadístico de las eficiencias obtenidas y el segundo, un estudio de casos que hizo posible la estimación de diferentes escenarios para los métodos a partir de variaciones en la ponderación de los criterios de selección. Se encontró que la eficiencia de los métodos de extracción depende de la cepa empleada siendo soxhlet el más eficiente en las 3 especies entre aquellos que requieren previa disrupción celular y entre todos los métodos los de mayor eficiencia fueron Soxhlet y Metanol/Cloroformo, siendo éste último también el más favorable en cuanto a costo y requerimientos energéticos pero no así para la toxicidad.

*Proyecto de Grado

**Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería Química. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Codirector: Ing. Ángel González.

ABSTRACT

TITLE: COMPARATIVE STUDY OF CELL DISRUPTION/EXTRACTION METHODS TO OBTAIN MICROALGAE IOL FROM NATIONAL BIOPROSPECTION MICROALGAES*.

AUTHORS: DIANA CATALINA MOLANO BAYONA, DIANA PAOLA ÁLVAREZ SUÁREZ**.

KEY WORDS: Microalgae, cell disruption, extraction, lipids.

Production of biodiesel from microalgae is promising as they have the potential to offer considerable amount of fuel from small crop areas and less production costs. Microalgae oil extraction is an important step in the production chain, which efficiency is related to global efficiency of the process.

The theme of this project is the comparison in terms of efficiency, costs, energetic consume and toxicity of five methods for microalgae oil extraction with chemical solvents and cell disruption. It was used hydrolysis with HCl 0.5M as cell disruption method for hexane and cyclohexane in-situ, soxhlet and ethanol/hexane methods and it was carried out the methanol/chloroform method from biomass that did not go under a stage of cell disruption as well. Two studies were developed in order to determinate the best of this procedures. The first one was a statistical analysis done over efficiency results, the second one was a study of cases which make possible to estimate different scenarios for the methods from variations on the criteria's selection adjustment. It was shown that soxhlet and methanol/chloroform methods are more efficient, being this last one also the most appropriate based on cost and energy requirements but not thus for the toxicity criteria.

* Undergrade Project

** Physical and Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Director: Dr. Sc.Viatcheslav Kafarov. Codirector: Ing. Ángel González.

INTRODUCCIÓN

El uso de combustibles fósiles como fuente de energía ha sido actualmente reconocido como insostenible, dado el agotamiento de recursos y el impacto ambiental de los gases efecto invernadero [1]. La producción de energía, bienes y servicios es necesaria, pero esta debe ser social, económica y ambientalmente sostenible [2]. Para tal fin se han considerado fuentes alternas de generación de energía como las microalgas que, con el aumento en los precios del petróleo, se han consolidado como una alternativa renovable y viable para la producción de biodiesel [3].

La cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas es un proceso conformado, en términos generales, por las etapas de cultivo, cosecha de la biomasa, secado, extracción de lípidos y transesterificación [4], siendo la etapa de extracción de aceite determinante en la producción de biodiesel. Los procedimientos de extracción de aceite deben ser favorables desde diferentes puntos de vista para ser considerados viables. El objetivo del presente trabajo es la comparación de 5 métodos de extracción de aceite con solventes químicos bajo los criterios de eficiencia, costo, requerimientos energéticos y toxicidad con el fin de determinar el mejor de estos procedimientos basados en estudios estadísticos de la eficiencia obtenida y del comportamiento de los métodos en diferentes escenarios.

1. MARCO TEÓRICO

Factores ambientales y económicos han llevado a la necesidad de considerar alternativas no convencionales de combustibles. Formas más limpias y económicas de energía toman fuerza en la actualidad. Este es el caso de los combustibles de tercera generación, a partir de aceite de microalgas [5].

1.1 GENERALIDADES DE MICROALGAS

Las microalgas son un grupo de microorganismos fotosintéticos que pueden crecer rápidamente y vivir en hábitats diversos. Son capaces de convertir la luz del sol, el agua, nutrientes inorgánicos y el dióxido de carbono en biomasa, produciendo eficientemente lípidos, carbohidratos y proteínas, en diferentes proporciones [6]. Se estima que existen más de 50000 especies pero solamente 30000 han sido estudiadas y analizadas[7]. Para el desarrollo de este estudio, se tomaron tres especies de bioprospección nacional promisorias para la obtención de biodiesel ya que son fácilmente aisladas y escaladas, de las cuales dos son del mismo filo y una de distinto analizando así la influencia de esto en la eficiencia de la extracción. Estas especies se presentan a continuación.

1.1.1 *Guinardia* sp. H Peragallo, 1892 Diatomea característica de ambientes salobres y marinos. Sus células son cilíndricas y se combinan para formar cadenas lineales de corta duración [8].

1.1.2 *Tetraedron* sp. Kützing, 1845 Clorofita plana triangular, cuadrangular o poligonal, cuya pared celular es relativamente delgada. La superficie celular de células jóvenes está provista con una red irregular, la cual desaparece en células

adultas. El contenido de la célula está compuesto por un núcleo, centriolos y un cloroplasto sencillo que llena completamente la célula [9].

1.1.3 *Amphiprora* sp. Ehrenberg, 1843 Es una diatomea que posee tallas cercanas a las 20 micras y forma rectangular 2:3. Se caracteriza por un rápido crecimiento y contenido de lípidos elevado. Su pared celular o frústulas de color amarillo oro consta de dos mitades que se sobreponen y adaptan entre sí, constituyendo las valvas [10].

1.2 OBTENCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS

En los procesos de obtención de aceite de algas se destacan 2 procedimientos: la disrupción celular y la extracción del aceite de la microalga [11].

1.2.1 Disrupción celular Tratamiento en el que se pretende destruir la pared celular de las microalgas para facilitar la recuperación de productos intracelulares y obtener mayor cantidad de lípidos [11]. Diferentes métodos pueden ser usados dependiendo de la composición de la pared celular de la microalga y de los productos a obtener, estos métodos pueden estar basados en acción mecánica (ultrasonido, autoclave y homogeneizadores) y no mecánica (shock osmótico y reacciones ácidas, básicas y enzimáticas) [7, 13].

El tipo de disrupción celular empleada en este trabajo fue la hidrólisis ácida ya que es el método que ofrece un mayor porcentaje de eficiencia de extracción para microalgas de bioprospección nacional [14]. En este método, los compuestos hidrosolubles presentes en la célula son disueltos por el ácido y forman un compuesto llamado masa solubilizada [15].

1.2.2 Métodos de extracción Para la obtención de lípidos presentes en microalgas a nivel laboratorio, se ha empleado una variada cantidad de métodos

tanto mecánicos como químicos. Estos últimos comprenden la extracción con solventes químicos que son los presentados en este trabajo [11].

1.2.2.1 Etanol-Hexano Se utiliza etanol en una primera etapa para recuperar el contenido lipídico de la microalga. Como segundo paso se genera la formación de un sistema bifásico mediante la adición de agua y hexano al extracto de aceite crudo obtenido anteriormente. Esta separación de fases ocurre dado la diferencia de solubilidades entre los solventes. Los lípidos se transfieren a la fase hexánica y las impurezas quedan retenidas en la fase hidroalcohólica [16].

1.2.2.2 Cloroformo-Metanol Método rápido de extracción en el cual la biomasa no requiere ser sometida a disrupción celular. Comprende las etapas de agitación, centrifugación, filtración y destilación. Emplea metanol, solvente polar para disolver lípidos polares, cloroformo, solvente no polar que disuelve lípidos neutros y agua, que al ser un solvente polar, permite separar las fases cloroformo/lípidos y metanol/lípidos [17]. Este método ha obtenido muy buenos resultados en la extracción de aceite de microalgas, sin embargo, posee la desventaja de ser poco amigable con el ambiente, debido a la toxicidad de los solventes [11].

1.2.2.3 Soxhlet con hexano Consiste en el calentamiento a ebullición del solvente, seguido de su condensación sobre el cartucho de biomasa, dando paso a la extracción sólido-líquido de los lípidos presentes en esta [18]. El proceso descrito se repite hasta alcanzar el tiempo de extracción establecido, momento en el cual se retira el cartucho con la biomasa residual y se lleva a cabo una destilación simple, con el fin de recuperar la mayor cantidad de solvente posible.

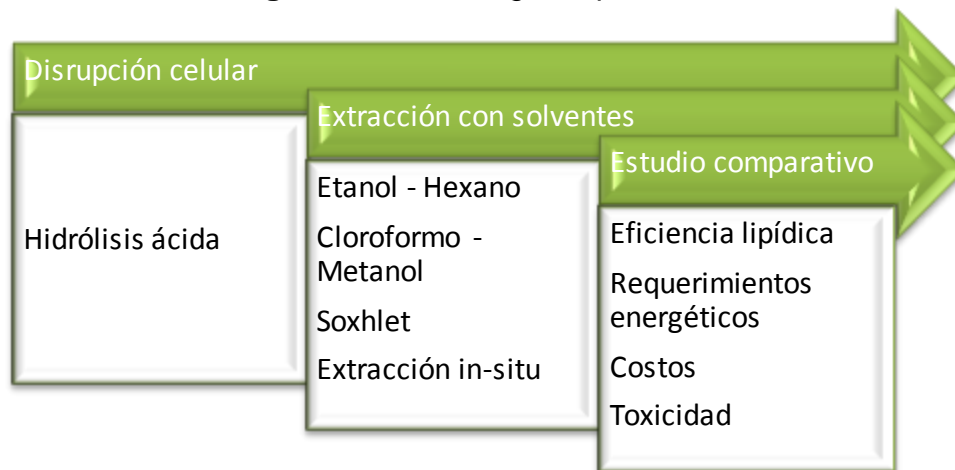
1.2.2.4 Extracción in-situ Método en que se agrega hexano ó ciclohexano fresco a la biomasa pretratada y se somete a agitación durante un periodo de

tiempo específico, con el fin de favorecer el contacto solvente-biomasa y aumentar la disolución [18,19]. Se separa la solución solvente-extracto de la biomasa por medio de filtración al vacío y se deja a evaporación.

2. DISEÑO METODOLÓGICO

La metodología desarrollada consta de 3 etapas, de las cuales 2 son experimentales: disrupción celular y extracción lipídica, complementadas con la comparación de los métodos. Esta última estudia criterios como: eficiencia, dado que a mayor cantidad de aceite extraído mayor será la cantidad de biodiesel producido; requerimientos energéticos que deben ser bajos para tener un equilibrio entre la energía producida y la empleada para este fin; costos, para que los procedimientos sean viables y toxicidad, que involucra aspectos ambientales y de seguridad industrial relacionados a los solventes usados.

Figura 1. Metodología experimental



Fuente: Los autores

2.1 MATERIALES

Pueden ser las microalgas o los solventes empleados para la extracción.

2.1.1 Materia prima Las microalgas utilizadas fueron suministradas por la Corporación Instituto de Morrosquillo (Punta Bolívar, Colombia) y caracterizadas por el Instituto Colombiano de Petróleo, ICP. Estas especies son *Guinardia* sp., *Tetraedron* sp. y *Amphiprora* sp., en la tabla 1 se muestran los porcentajes lipídicos de estas especies otorgado por el ICP. Cultivadas en medio f/2, cosechadas por floculación, secadas al sol y refrigeradas hasta su utilización.

Tabla 1. Especies usadas y sus porcentajes lipídicos

Espece	Guinardia	Tetraedron	Amphiprora
% lípidos	7,5	9,87	12
% cenizas	67,4	22,64	52,8

Fuente: Informe del ICP y los autores

2.1.2 Reactivos Durante el proceso de disrupción celular se utilizó ácido clorhídrico al 37% y para la extracción con los distintos métodos, los solventes empleados fueron: n-hexano, ciclohexano, cloroformo, metanol y etanol. Adicionalmente durante todo el proceso se utilizó agua destilada como agente de disolución y lavado.

2.2 EQUIPOS

Los equipos utilizados se listan a continuación:

- Balanza analítica. Precisa modelo XB220A.
- Plancha de calentamiento con agitación. Wisestir MSH20D.
- Equipo de filtración al vacío. Bomba Emerson 1/6 HP.
- Horno digital de convección. WTC binder.
- Homogenizador. Heidolph SilentCrusher.
- Manta de calentamiento. Glassco DIN 12347.

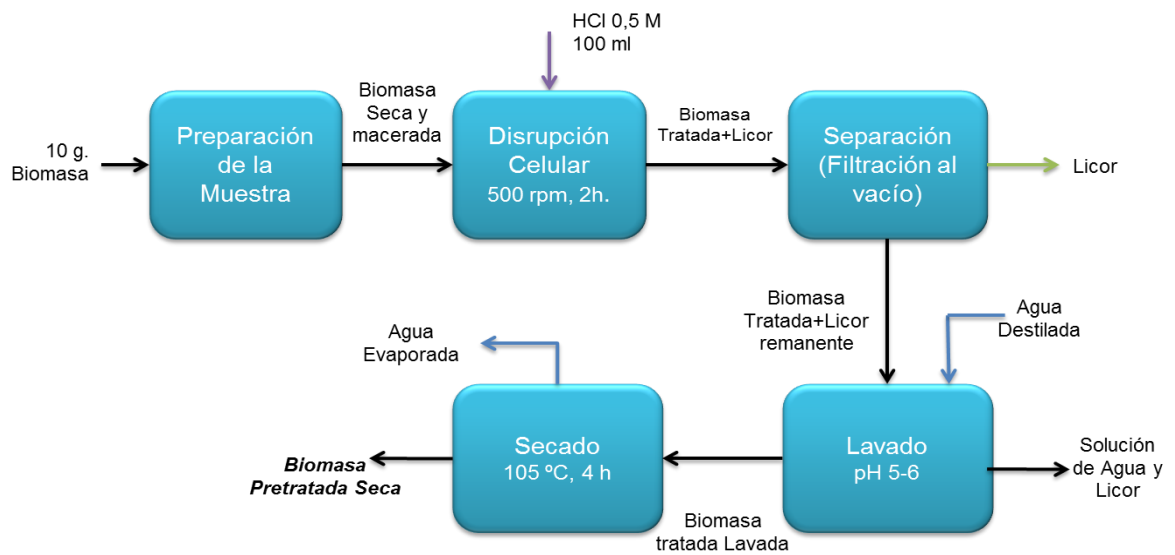
- Centrifuga. UNICO MX C8624.

2.3 PROCEDIMIENTO

Las etapas experimentales son la degradación de la pared celular y la extracción del aceite utilizando solventes.

2.3.1 Disrupción celular Se llevó a cabo disrupción celular química con ácido clorhídrico de acuerdo al procedimiento mostrado en la figura 2.

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de disrupción celular



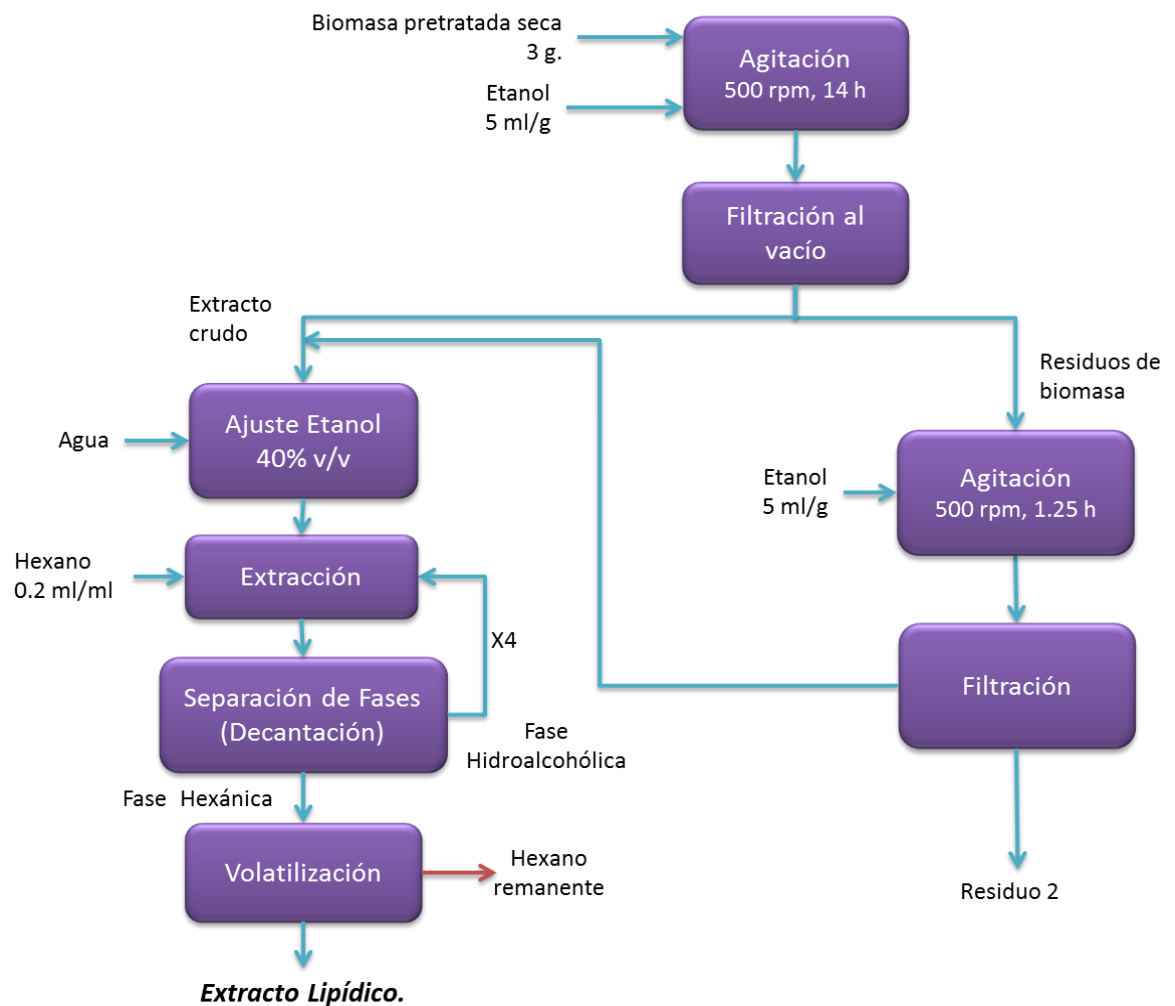
Fuente: Los autores

2.3.2 Métodos de extracción Los métodos de extracción se desarrollaron de acuerdo a la metodología experimental y a los protocolos de extracción del laboratorio de biomasa de la UIS [20]. Se realizaron 2 experimentos de cada

método (prueba y repetición), y una tercera prueba cuando se vio gran divergencia en los resultados.

2.3.2.1 Etanol hexano Es una extracción en múltiples etapas en la que la separación de la fase hexánica de la hidroalcohólica se repite 5 veces. El proceso se representa en la figura 3.

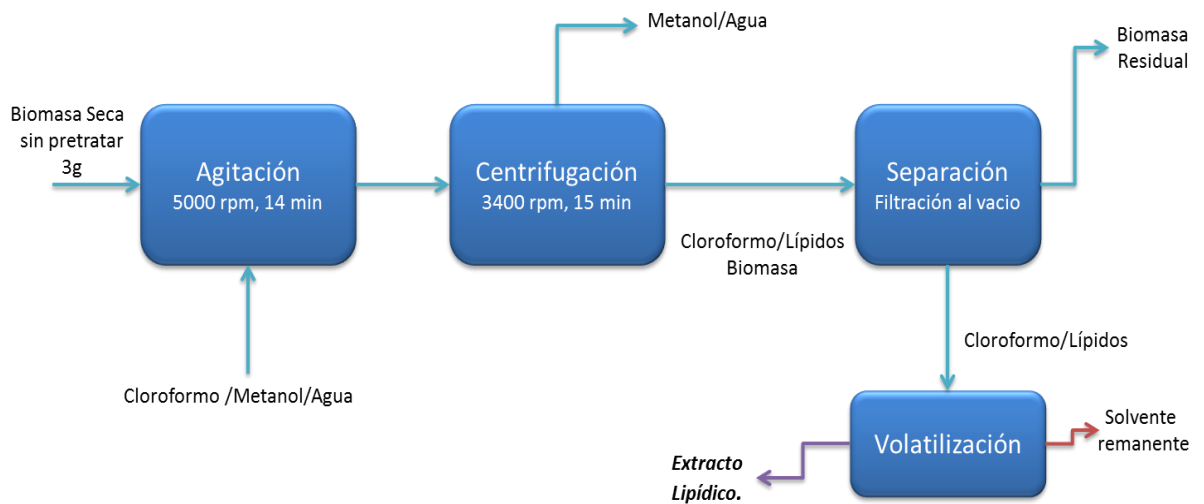
Figura 3. Diagrama flujo del método etanol-hexano



Fuente: Los autores

2.3.2.2 Cloroformo metanol: El procedimiento seguido para la realización de este método se presenta en la figura 4. La extracción se desarrolló siguiendo la metodología experimental.

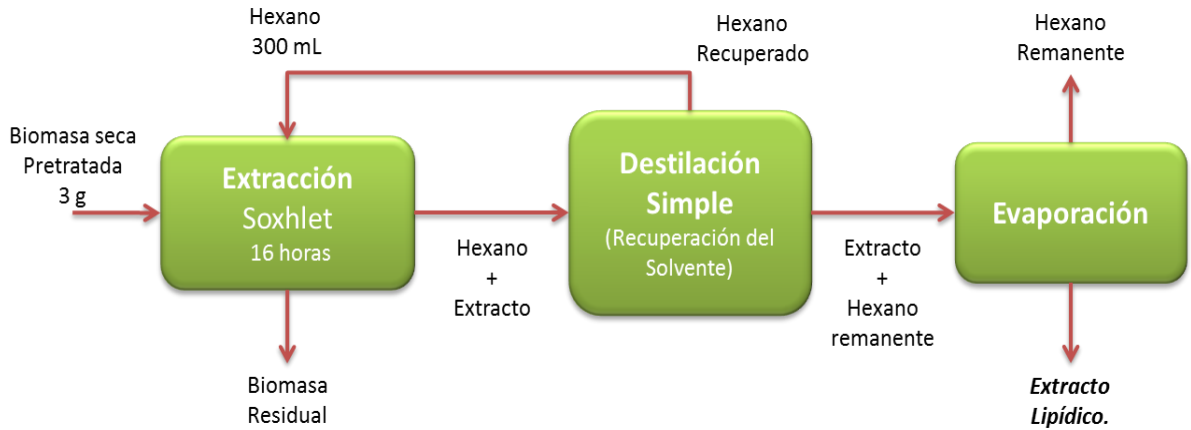
Figura 4. Diagrama de flujo del método cloroformo metanol



Fuente: Los autores

2.3.2.3 Soxhlet El procedimiento se sintetiza en la figura 5, se llevan a cabo múltiples extracciones y luego se deja el extracto a volatilización para obtener finalmente el aceite.

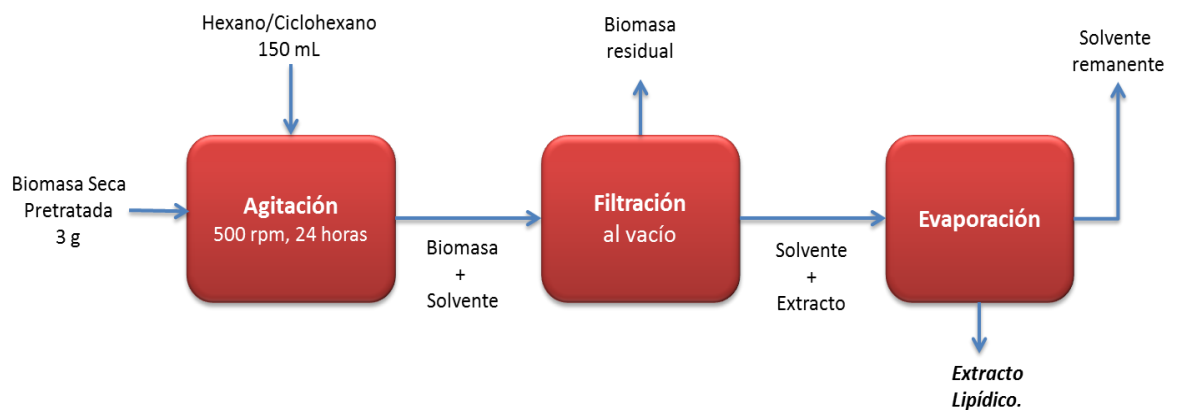
Figura 5. Diagrama de flujo del método soxhlet



Fuente: Los autores

2.3.2.4 Extracción in situ La metodología in-situ se desarrolló con 2 solventes distintos, hexano y ciclohexano siguiendo el mismo procedimiento y el esquema del proceso se presenta en la figura 6.

Figura 6. Diagrama de flujo del método in-situ



Fuente: Los autores

2.3.3 Cuantificación del extracto A partir del análisis gravimétrico hecho a cada prueba y los datos mostrados en la tabla 1, se determinaron los rendimientos y eficiencias para cada uno de los métodos aplicados a las diferentes especies, por medio de las siguientes ecuaciones:

$$m_0 = \frac{m_p}{\%Rec_p} * 100 \quad (1)$$

Donde m_0 corresponde a la cantidad de biomasa inicial sin pretratar que fue sometida a extracción, ya que el procedimiento de disrupción fue desarrollado para una gran cantidad de biomasa y en este se presentan pérdidas de materia; m_p equivale a la cantidad de biomasa pretratada sometida a extracción en cada prueba realizada. Finalmente $\%Rec_p$ se refiere a la biomasa recuperada después del pretratamiento.

$$\%Rendimiento = \frac{m_e}{m_0} * 100 \quad (2)$$

La ecuación 2 indica el rendimiento de aceite obtenido para cada prueba con relación a la biomasa empleada, siendo m_e la masa del extracto lipídico obtenido luego de la aplicación del método.

$$\%Eficiencia = \frac{\%Rendimiento}{\% \text{ lípidos ICP}} \quad (3)$$

La eficiencia es el valor de interés que hace posible la comparación de los métodos en distintas especies. En la ecuación 3 el término $\% \text{ lípidos ICP}$ corresponde al valor de lípidos de las 3 especies empleadas, que está referenciado en la tabla 1.

2.4 ESTUDIOS COMPARATIVOS

Se recurre a la microscopia para ver el efecto de los tratamientos sobre la morfología de las células y relacionar esto con la eficiencia de cada uno. Mediante análisis estadístico se comparan los métodos en cuanto a su eficiencia. Por otra

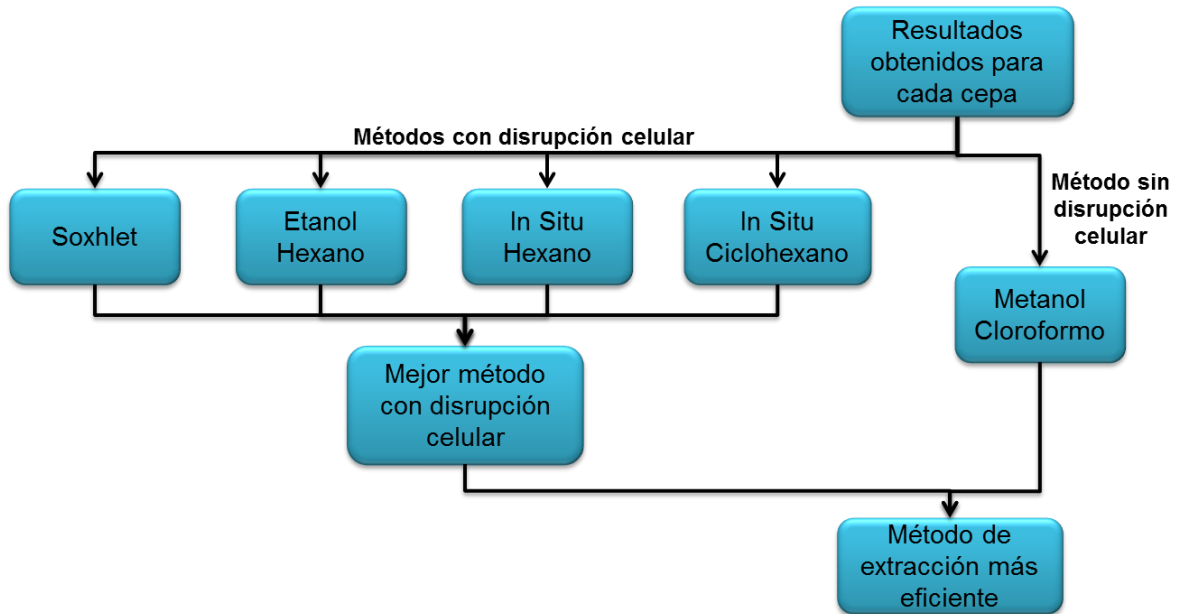
parte, con el análisis de escenarios se varía la ponderación dada a cada criterio de selección (costo, requerimientos energéticos, eficiencia y toxicidad), y así tener mayor claridad en la escogencia del método más apropiado para cada especie.

2.4.1 Respuesta morfológica Se lleva a cabo observación en microscopio óptico de las especies antes y después de la disrupción celular; así como de las muestras después de la aplicación de los métodos para ver el daño hecho a las células en cada procedimiento.

2.4.2 Análisis ANOVA y prueba de múltiples rangos Este estudio se realiza con el software STATGRAPHICS Centurion XVI utilizando la herramienta “comparación de varias muestras” para los resultados de extracto lipídico de cada método y género de microalga. La tabla ANOVA es el análisis de varianza que se realiza a los datos, buscando aceptar o rechazar la hipótesis H_0 que afirma que sus medias son iguales (p -valor >0.05 se acepta H_0 y p -valor <0.05 se niega H_0). A partir de esta tabla se determina si hay diferencias significativas entre los datos y con una prueba de múltiples rangos, se determina entre cuales de estos se presenta dicha diferencia.

La comparación de los métodos debe hacerse en aquellos que tienen procedimientos similares [19], por esto se hace necesario llevar a cabo un sistema de selección que permita determinar el mejor método en un conjunto de afines desde el punto de vista estadístico, tomando en cuenta las eficiencias de extracción. Esta metodología es mostrada en la figura 7.

Figura 7. Metodología de comparación de los métodos



Fuente: Los autores

2.4.3 Casos de estudio Se analizan varios escenarios teniendo en cuenta diferentes criterios de comparación como requerimientos energéticos, costos, toxicidad y eficiencia (numeral 2.4.2) y se toma una muestra de 10 considerando la eficiencia como aspecto principal. El primer paso en el estudio de escenarios es la normalización de los datos de los criterios de selección, con el fin de tener valores en una escala de 1 a 100 que facilite el análisis. Luego se relaciona cada resultado de estos criterios con un valor de ponderación variable en la sumatoria de todas las variables siguiendo la ecuación 4, el valor obtenido se llama total que es único para un método en una especie y será útil en las posteriores comparaciones.

$$Total_{m\acute{e}t} = \sum_1^c (p_c * valor_c) \quad (4)$$

Donde p es la ponderación asignada a determinado criterio, c es el criterio y valor es la cantidad normalizada de cada criterio, todo esto para cada método.

Empleando la herramienta solver de Microsoft Office Excel 2007, se calculan los valores de ponderación que determinan el mejor escenario para cada método. El administrador de escenarios de la herramienta “análisis Y si” del mismo software, se utilizó para el estudio del comportamiento de los métodos frente a diferentes valores de ponderación asignados aleatoriamente, dándole prevalencia a la eficiencia.

2.4.3.1 Estudio de requerimientos energéticos Para determinar los métodos con menores requerimientos energéticos se calculó la energía gastada de cada uno de estos siguiendo la ecuación 5.

$$E_{mét} = \sum_1^n P_{eq} \cdot t_{et} \quad (5)$$

En donde P_{eq} es la potencia nominal de cada equipo, t_{et} equivale al tiempo durante el cual se utiliza el mismo y n corresponde al número de equipos usados. Las potencias de los equipos empleados se registran en la tabla 2. Considerando a partir de estas potencias el máximo requerimiento energético de los métodos.

Tabla 2. Potencia nominal de los equipos usados

Equipo	Potencia [W]
Bomba de filtración al vacío	124,3
Horno digital de convección	1200
Plancha de calentamiento con agitación	1200
Manta de calentamiento	200
Homogeneizador Silentcrusher	130
Centrífuga	575,5

Fuente: Los autores

2.4.3.2 Estudio de costos Con el fin de hallar el método más económico se determina el costo de cada uno a partir de la ecuación 6.

$$C_{m\acute{e}t} = \sum_1^m C_{solv} \cdot V_{solv} + otros \quad (6)$$

En la cual C_{solv} indica el valor de determinado solvente por unidad de volumen, los costos de los solventes engrado analítico son presentados en la tabla 3; V_{solv} se refiere al volumen utilizado de dicho solvente y m representa el solvente sobre el cual se hace el cálculo. Por otra parte, el término *otros* corresponde a un estimativo del costo de otros implementos usados en la realización de cada método como es el caso de papeles filtro e indicadores de pH y en el caso de la extracción soxhlet se agrega un término correspondiente al costo del servicio de agua de acuerdo a su precio en la ciudad de Bucaramanga y el flujo empleado.

Tabla 3. Costo de los reactivos

Materias primas	Valor [\$/ml]
n-Hexano	9,94
Ciclohexano	143,60
Etanol	6,66
Metanol	29,00
Cloroformo	45,40
Ácido clorhídrico 37%	27,92
Agua (serv. Industrial)	1,271E-6

Fuente: Los autores

2.4.3.3 Toxicidad Se hizo una relación del $DL_{50\%}$ [21] para los solventes utilizados con el método correspondiente. Se consideró 100% tolerable (en comparación con los otros) al reactivo cuyo $DL_{50\%}$ es el mayor, con el fin de establecer cuál de estos es el menos nocivo y a partir de ese valor se calcularon los porcentajes de los demás, estos porcentajes son mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Criterio de toxicidad de los reactivos

SOLVENTES	DL50 (mg/Kg)	% Tolerancia relativa
Hexano	28710	100,00
Etanol	10600	36,92
Metanol	7500	26,12
Ciclohexano	6200	21,60
Cloroformo	1194	4,16

Fuente: Los autores

Para determinar el % tolerancia relativa de los métodos que mezclas de solventes se toma el valor del solvente más tóxico (el menos tolerable).

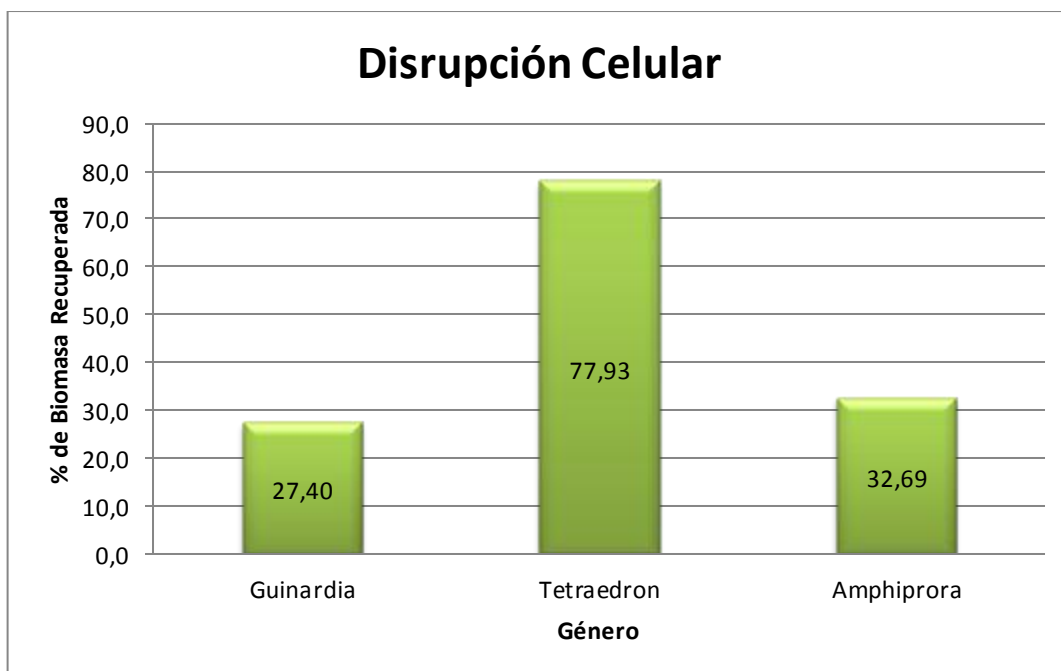
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los estudios comparativos arrojaron resultados que permiten la selección de los métodos de extracción más eficiente y su comparación en diferentes contextos.

3.1 DISRUPCIÓN CELULAR

Dado que durante esta etapa, las cenizas y el material celulósico junto con los azúcares son degradados, la biomasa recuperada es rica en lípidos y aprovechada para la extracción. Los porcentajes de material no hidrolizable en la biomasa obtenidos en esta etapa son presentados en la figura 8.

Figura 8. Rendimiento en el proceso de disrupción celular



Fuente: Los autores

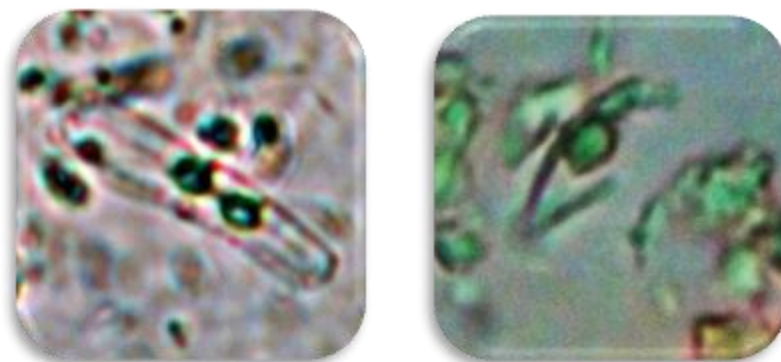
La variación de los resultados se justifica con la taxonomía de las especies y el floculante usado en el proceso de cosecha ya que queda en la célula como cenizas. La hidrólisis empleada cumplió con el objetivo de remover los azúcares y cenizas que poseen porcentajes similares para especies del mismo filo como se muestra en la tabla 1 y cuyos valores están relacionados con los porcentajes de biomasa recuperada.

3.2 RESPUESTA MORFOLÓGICA

Se observaron las células al microscopio con 100x de aumento evidenciándose la influencia de los procedimientos en la morfología de las especies.

Guinardia sp.: mostró células intactas después de la hidrólisis, su pared celular no presentó desprendimiento, sin embargo, la microscopía después de la extracción metanol cloroformo permitió afirmar que las altas velocidades de agitación debilitan la estructura celulósica de la pared y la sílice que la compone, lo que facilita la entrada del solvente y la extracción de lípidos y otro tipo de material intracelulósico como fosfolípidos, pigmentos, azúcares entre otros.

Figura 9. Imágenes de microscopía *Guinardia* sp.

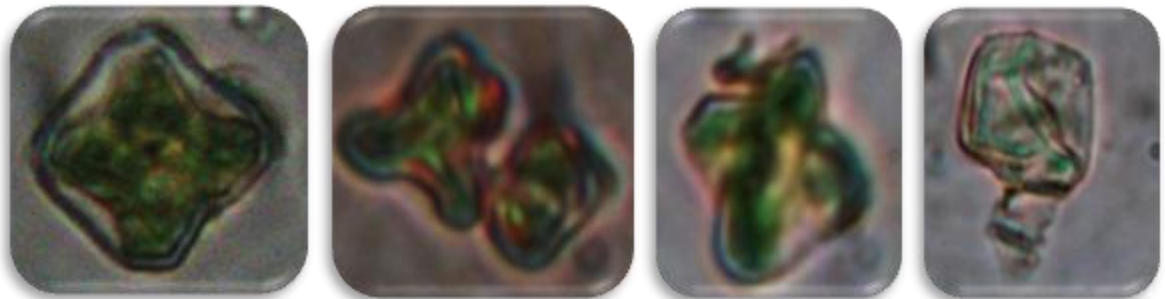


(A) Células sin pretratar (B) Células después de metanol cloroformo

Fuente: Los autores

Tetraedron sp.: después del pretratamiento, la morfología de las células cambió notoriamente, estas fueron achatadas y no se observó la pared celular. Luego de cada extracción las células perdían gran parte de su contenido celular, especialmente para soxhlet debido a la sensibilidad de la cepa al choque térmico.

Figura 10. Imágenes de microscopía *Tetraedron* sp.



(A) Célula inicial (B) Célula pretratada (C, D) Células después de Soxhlet

Fuente: Los autores

Amphiprora sp.: no se detectó la estructura de la pared celular después del pretratamiento, la morfología celular se alteró notoriamente y por esta razón las células sometidas a extracción perdieron gran parte de su contenido citoplasmático. En el método soxhlet se observaron frústulas totalmente vacías, se apreciaron las estrías y la morfología totalmente alterada; además se vieron ciertas estructuras circundantes, al parecer restos celulares

Figura 11. Imágenes de microscopia *Amphiprora* sp.



(A) Célula sin pretratar (B) Célula pretratada (C) Sometida a Soxhlet

Fuente: Los autores.

3.3 COMPARACIÓN DE EFICIENCIAS DE EXTRACCIÓN.

Los resultados de las eficiencias de extracción de aceite usando los 5 métodos en las 3 especies se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Eficiencias obtenidas experimentalmente

Método Especie	INSITU HEXANO	INSITU CICLOHEXANO	SOXHLET	METANOL CLOROFORMO	ETANOL- HEXANO
GUINARDIA	9,55 +/- 3,6	12,83 +/- 0,4	13,15 +/- 1,0	100 +/-1,7	9,28 +/- 1,7
TETRAEDRON	11,44 +/- 4,0	18,28 +/- 0,4	100 +/-10,5	50,57 +/- 15,1	14,69 +/- 4,9
AMPHIPRORA	26,01 +/- 2,4	21,08 +/- 3,9	37,07 +/- 2,6	34,90 +/- 1,9	15,24 +/- 2,1

Fuente: Los autores

Los métodos que presentaron mayores eficiencias fueron metanol cloroformo y soxhlet, sin embargo su reproducibilidad es baja dado que estos valores varían de una cepa a otra esto puede deberse a la composición de la pared celular y a la afinidad de los solventes con la estructura celular, por el contrario los resultados

obtenidos para los métodos in situ, y etanol hexano fueron bajos pero similares en las diferentes especies lo cual muestra la reproducibilidad.

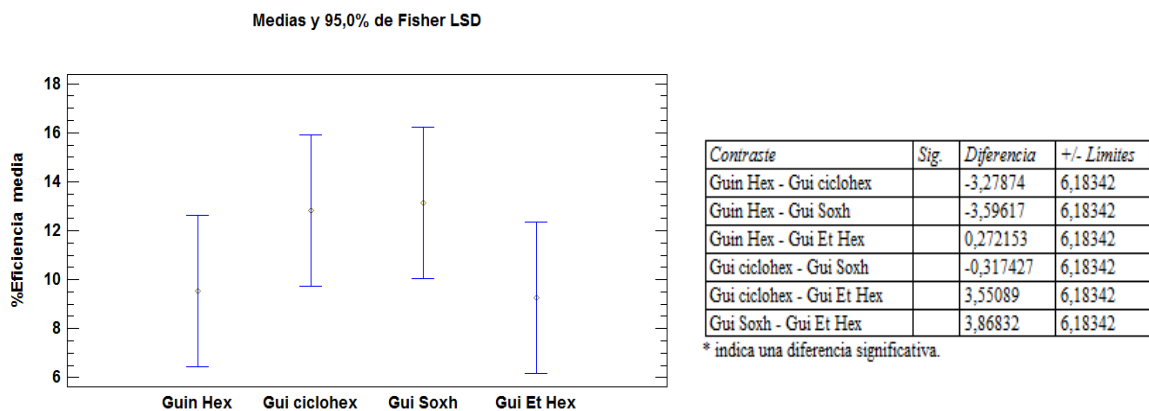
La variación de las eficiencias de los diferentes métodos se debe a la sensibilidad de la pared celular frente al calentamiento y la agitación a elevadas velocidades así como del solvente empleado y el tiempo de duración de cada procedimiento.

3.3.1 Análisis ANOVA y pruebas de múltiples rangos

Los resultados de eficiencias de las diferentes especies sometidos a un análisis estadístico y comparado en grupos de iguales son mostrados a continuación.

Para *Guinardia* sp. los métodos con disrupción celular y mayores eficiencias fueron soxhlet e insitu ciclohexano, esto se puede apreciar en la figura 12a donde se muestra el gráfico de medias. En la figura 12b se observa la prueba de múltiples rangos, que indica que no hay diferencias significativas entre los 4 métodos, de modo que se escogió soxhlet en virtud de la posterior comparación con metanol clorofromo y debido a sus buenos resultados en las otras especies.

Figura 12. Gráfico de medias y prueba de múltiples rangos, *Guinardia* sp.



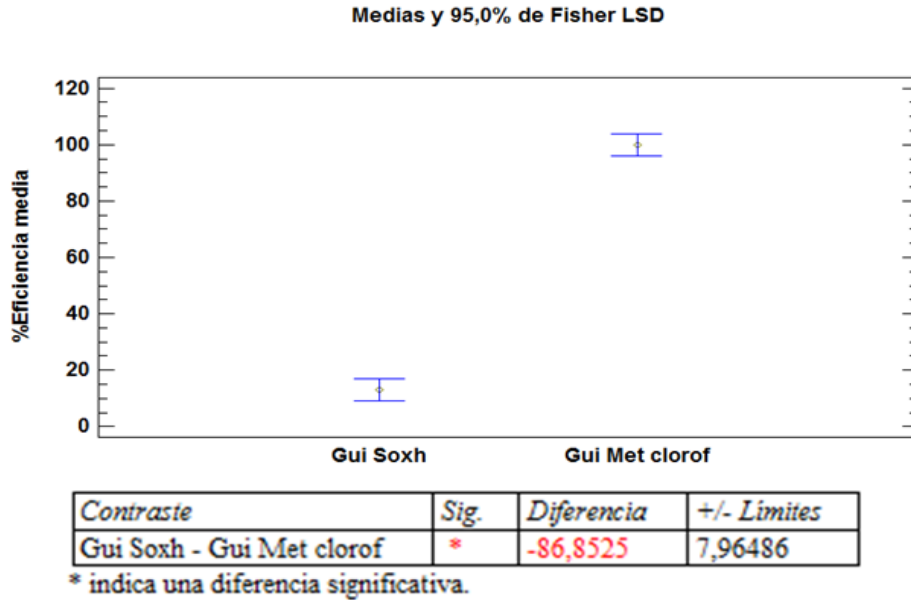
a) Gráfico de medias

b) Prueba de múltiples rangos

Fuente: Los autores

Se comparó soxhlet con metanol cloroformo y se encontró que este último arroja una eficiencia significativamente mayor como se observa en la figura 13.

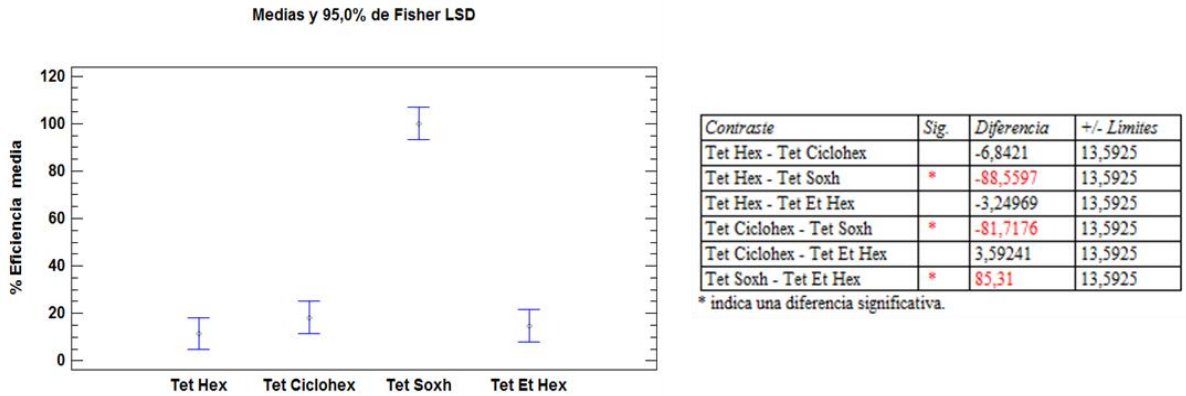
Figura 13. Soxhlet vs metanol cloroformo, *Guinardia* sp.



Fuente: Los autores.

La figura 14a muestra la distribución de los valores de medias arrojado por el análisis estadístico realizado a las eficiencias de cada método para *Tetraedron* sp. No se observaron diferencias entre los métodos in situ hexano, in situ ciclohexano y etanol hexano. No obstante, las eficiencias obtenidas por ellos difieren en gran magnitud de la obtenida con el método soxhlet, el cual se destacó como el mejor en este caso. Lo anterior también se puede observar en la figura 14b, donde se muestran las diferencias significativas entre grupos dada por la prueba de múltiples rangos.

Figura 14. Gráfico de medias y prueba de múltiples rangos, *Tetraedron* sp.



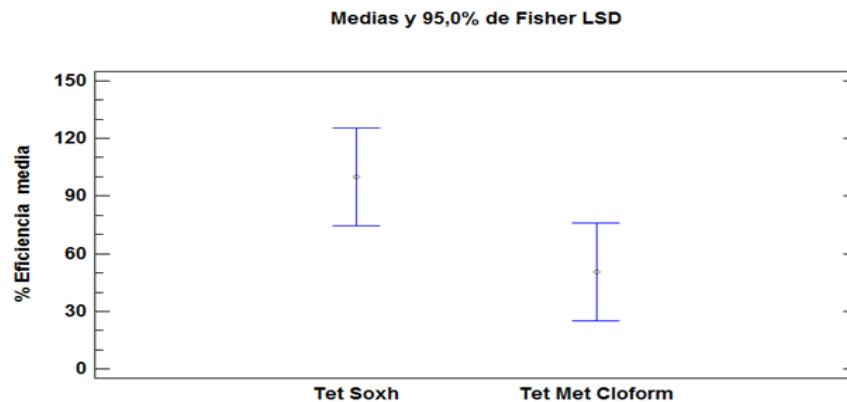
a) Gráfico de medias

b) Prueba de múltiples rangos

Fuente: Los autores

La comparación de los métodos soxhlet y metanol cloroformo no arrojó diferencias significativas, dada la mayor eficiencia y la menor desviación de soxhlet lo hacen el más recomendable para esta especie.

Figura 15. Soxhlet vs metanol cloroformo, *Tetraedron* sp.



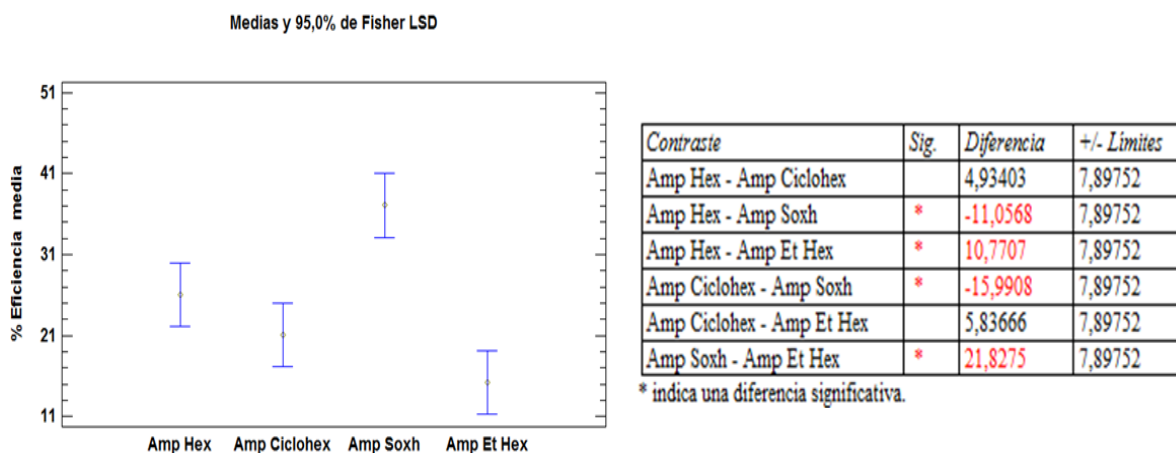
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Tet Soxh - Tet Met Cloform		49,4343	51,0817

* indica una diferencia significativa.

Fuente: Los autores

Las eficiencias medias de extracción para la especie *Amphiprora* sp. se ven representadas en la figura 16a. El resultado de la prueba de múltiples rangos entre las metodologías de extracción se esquematiza en la figura 16b, en la que el método soxhlet muestra diferencias destacables con relación a los tres restantes, por lo tanto se considera como la mejor ruta de extracción de aceite para esta especie cuando se efectúa hidrólisis ácida.

Figura 16. Gráfico de medias y prueba de múltiples rangos, *Amphiprora* sp.



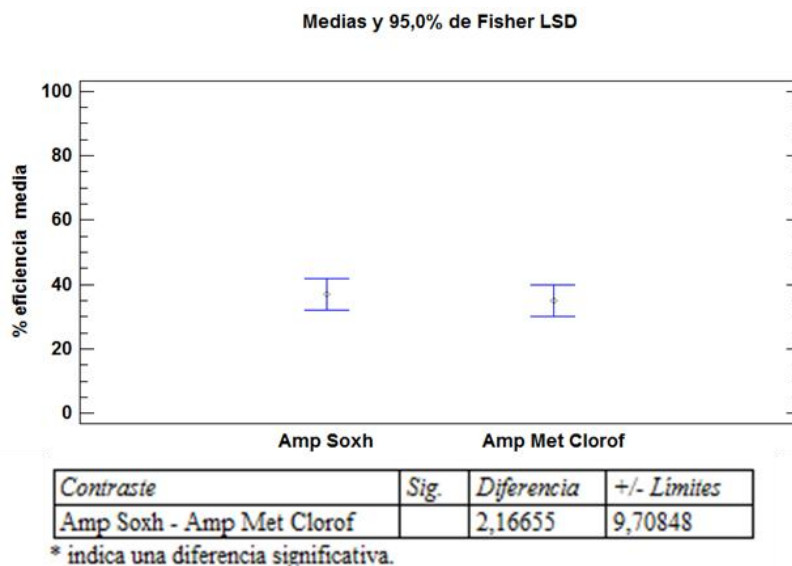
a) Gráfico de medias

b) Prueba de múltiples rangos

Fuente: Los autores

La comparación de soxhlet con metanol cloroformo de la figura 17 evidencia la similitud de los resultados, por lo cual no es posible seleccionar uno como el mejor únicamente a partir de la eficiencia.

Figura 17. Soxhlet vs. metanol cloroformo, *Amphiprora* sp.



Fuente: Los autores

Ninguno de los métodos evaluados logró eficiencias superiores al 40% para *Amphiprora* sp., esto hace que esta especie sea poco promisoría para extracción.

3.4 CASOS DE ESTUDIO

Para este estudio se tuvieron en cuenta los resultados del análisis energético, de costos y toxicidad realizados a los métodos, cuyos valores son independientes de la especie usada. Estos se registran en la tabla 6.

Tabla 6. Energía, costo y toxicidad de los métodos empleados

Método	Energía [KWh]	Costo [\$]	%Tolerancia relativa
Metanol Cloroformo	0,1844	2563,44	4,16
Soxhlet	18,98	3448,65	100
In-situ ciclohexano	36,26	21689,06	21,59
In-situ hexano	36,26	1639,69	100
Etanol Hexano	26,76	1039,62	36,92

Fuente: Los autores

Se plantearon 10 posibles escenarios en los cuales se variaron las ponderaciones de los criterios, asegurando que la eficiencia no fuera menos importante que ningún otro. La variación en las ponderaciones de los criterios se hizo siguiendo un orden descendente con el ánimo de llegar a encontrar la influencia de esto en el comportamiento de los métodos, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Estudio de escenarios

Escenario	1	3	2	4	5	6	7	9	8	10
Eficiencia	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3
Energía	0,1	0,3	0,2	0,3	0,25	0,15	0,1	0,1	0,1	0,3
Costo	0,2	0,1	0,2	0,2	0,25	0,25	0,2	0,15	0,1	0,2
Toxicidad	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,35	0,4	0,2
GUINARDIA										
MetClo	88,0	89,1	88,0	87,9	87,3	77,8	68,8	64,6	60,4	78,3
Soxhlet	39,6	39,3	42,9	46,4	48,3	53,4	56,8	57,6	58,4	55,1
In situ Ciclohex	9,9	8,6	8,6	7,3	7,3	9,5	11,6	12,7	13,8	8,2
In situ Hexano	34,2	24,0	33,3	32,3	36,9	46,9	52,3	52,7	53,1	41,4
Et Hex	30,9	25,7	32,6	34,3	37,8	38,8	36,4	33,5	30,6	37,1
TETRAEDRON										
MetClo	58,3	64,4	63,2	68,1	67,6	58,0	49,1	44,9	40,7	63,5
Soxhlet	91,6	82,7	86,4	81,1	82,9	88,2	91,6	92,4	93,2	81,1
In situ Ciclohex	13,1	11,3	11,3	9,5	9,5	11,6	13,8	14,9	16,0	9,8
In situ Hexano	35,9	25,2	34,8	33,6	38,4	48,4	53,6	53,9	54,1	42,5
Et Hex	33,6	28,1	34,8	35,9	39,2	40,3	38,1	35,3	32,5	38,1
AMPHIPRORA										
MetClo	48,9	56,5	55,4	61,9	61,3	51,8	42,8	38,6	34,4	58,8
Soxhlet	53,8	51,2	54,9	55,9	57,8	63,0	66,4	67,2	68,0	62,2
In situ Ciclohex	14,8	12,7	12,7	10,6	10,6	12,8	14,9	16,0	17,1	10,6
In situ Hexano	44,1	32,3	41,5	38,9	43,5	53,5	58,9	59,3	59,6	46,3
Et Hex	34,5	28,7	35,6	36,7	40,1	41,2	38,8	35,9	33,0	38,9

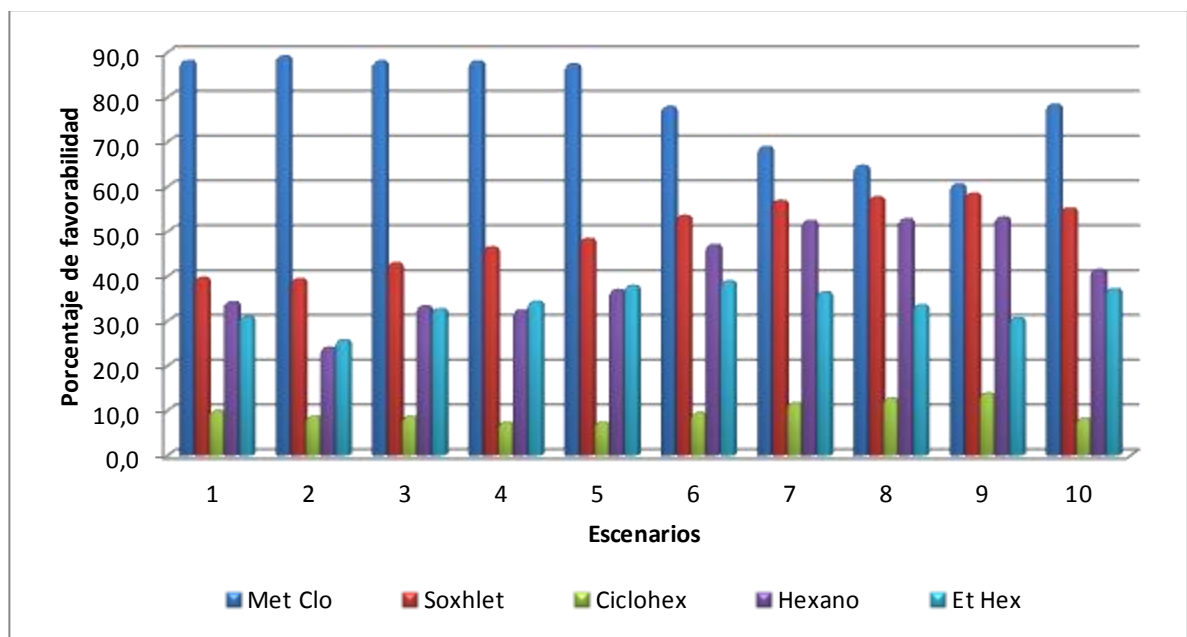
Fuente: Los autores

El método metanol cloroformo se comporta mejor cuando se asignan altas ponderaciones a los costos, la eficiencia y la energía pero al aumentar la importancia del *%tolerancia relativa* disminuye notoriamente el valor *total*, esto se

debe a la alta toxicidad del cloroformo. Se observa que cuando la toxicidad se pondera por encima del 30% el método soxhlet, que también tiene muy buenos resultados, puede ser el más recomendado ya que es más amigable ambientalmente.

Guinardia sp.: El método más conveniente para esta especie es metanol cloroformo como se puede observar en la figura 18., aunque su comportamiento disminuye notoriamente en los escenarios donde la toxicidad tiene mayor ponderación.

Figura 18. Favorabilidad de los métodos en *Guinardia* sp.

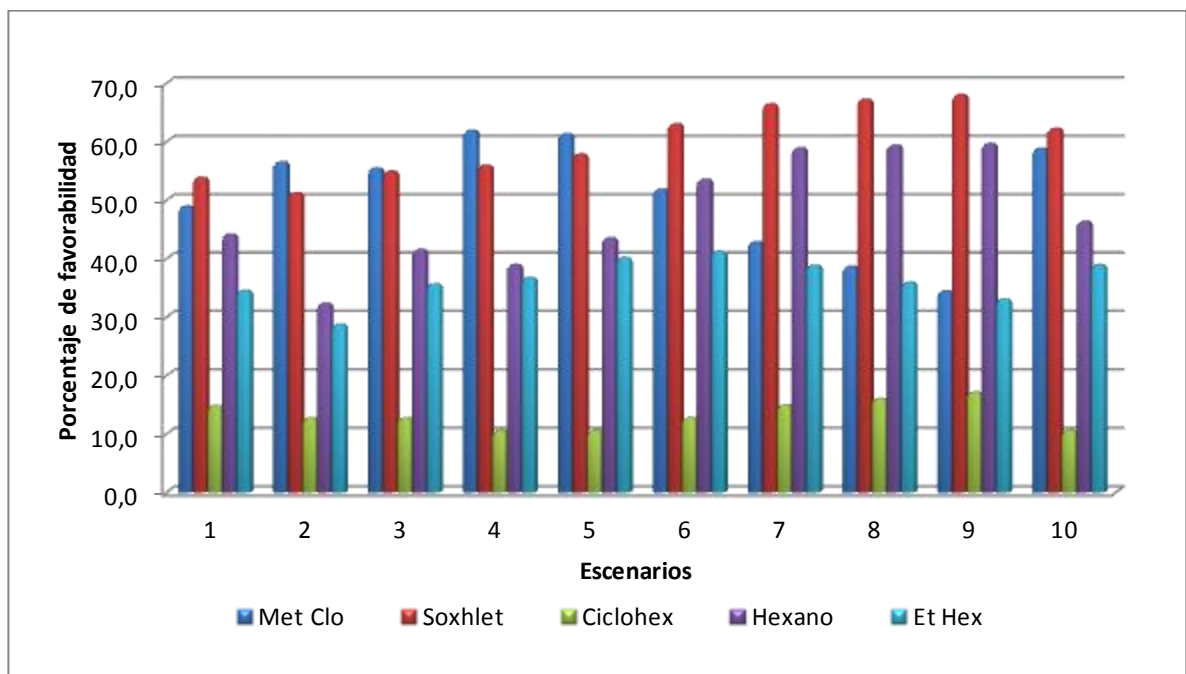


Fuente: Los autores

Amphiprora sp.: Los métodos metanol cloroformo y soxhlet son los que presentan mejores resultados en esta especie siendo soxhlet sobresaliente en los escenarios donde la toxicidad tiene mayor ponderación y los requerimientos energéticos

menor. Esto indica que no es posible estandarizar un método para esta especie ya que su comportamiento oscila entre valores muy cercanos en los escenarios evaluados.

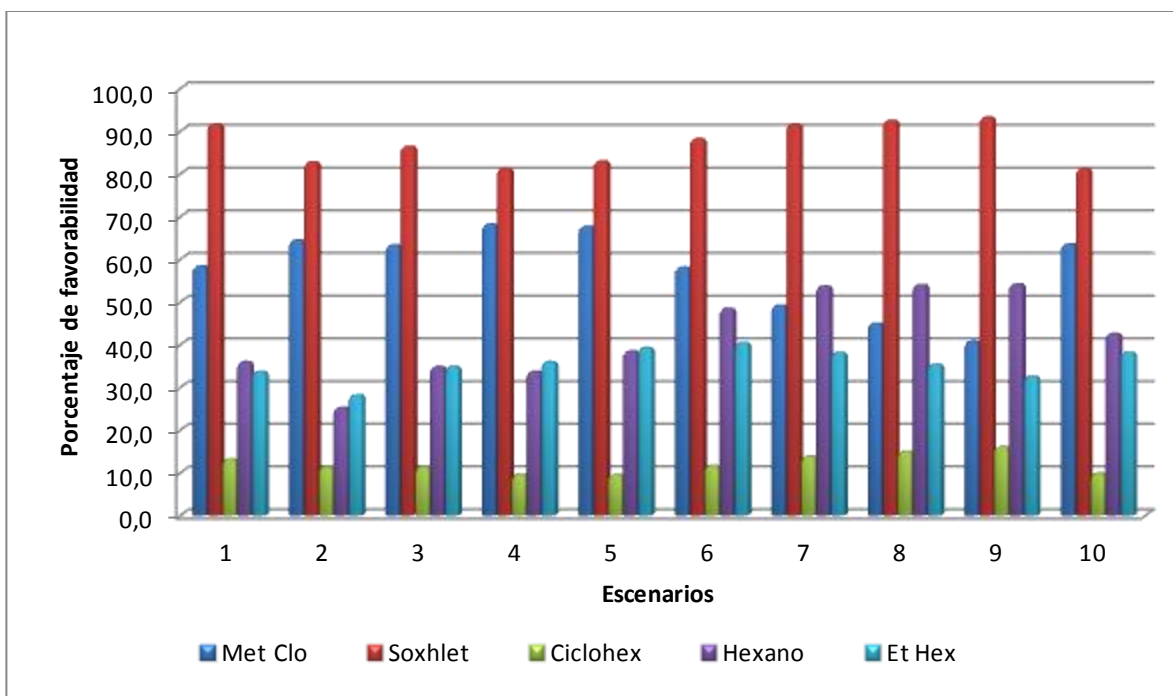
Figura 19. Favorabilidad de los métodos en *Amphiprora* sp.



Fuente: Los autores

Tetraedron sp.: El calor proporcionado por soxhlet hace la pared celular más maleable lo cual toma ventaja de la sensibilidad de esta especie, permitiendo ubicar a soxhlet como el mejor en todos los escenarios evaluados como se ve en la figura 19.

Figura 20. Favorabilidad de los métodos en Tetraedron sp.



Fuente: Los autores

Teniendo en cuenta los diferentes criterios, siguen ubicándose metanol cloroformo y soxhlet como los mejores métodos de extracción. Sin embargo, no es posible estandarizar alguno de estos como el más apropiado para la obtención de aceite de microalgas ya que esto depende del género de microalga y del contexto de evaluación según lo visto en este estudio.

4. CONCLUSIONES

- El procedimiento de hidrólisis empleado remueve eficientemente las cenizas y material hidrosoluble de las microalgas. Esto se ve reflejado en la relación coherente del porcentaje de biomasa recuperada con la cantidad de cenizas presentes en las microalgas.
- La disrupción celular y extracción tienen diferentes efectos en el comportamiento morfológico de las microalgas que van desde la deformación celular para *Tetraedron* sp. pretratada, hasta la ruptura en *Guinardia* sp. llevada a extracción con metanol cloroformo y la liberación de contenido intracelular de *Amphiprora* sp. y *Tetraedron* sp. sometidas a extracción con soxhlet.
- Para los métodos de extracción de aceite que no requieren previa disrupción celular de la biomasa, se observó que Soxhlet es el más eficiente en los tres géneros de microalga debido al calentamiento proporcionado.
- Con base en el estudio de escenarios llevado a cabo los métodos soxhlet y metanol cloroformo presentan mejores resultados, sin embargo no es adecuado establecer de un método estándar para todas las cepas. Por otro lado, soxhlet es el más favorable desde el punto de vista ambiental ya que al aumentar la ponderación del criterio *%tolerancia relativa* mejora sus resultados llegando incluso a superar a metanol cloroformo.

5. RECOMENDACIONES

- Caracterizar el extracto lipídico obtenido en los diferentes métodos con el fin de determinar la selectividad de los solventes.
- Llevar a cabo un análisis de impactos de los solventes con base en criterios de efectos a la salud, emisiones, corrosión, inflamabilidad, reactividad, almacenaje entre otros y llevar esto a términos económicos para estudiar cómo afecta este criterio la factibilidad a escala industrial de los métodos.
- Estudiar viabilidad económica de escalamiento de los 2 métodos sobresalientes en este estudio basado en el diseño preliminar de una planta extractora de aceite de microalgas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SHAKEEL, RASHMI, HUSSAIN, PRASAD and BANERJEE. Prospects of biodiesel production from microalgae in India : Microalgae are emerging feedstock for biodiesel production. En : Elsevier : Renewable and sustainable energy reviews. Vol. 13 (2009); 2361-2372.
2. CHISTI Yusuf. A bioeconomy vision of sustainability. En : Society of Chemical Industry and John Wiley & Sons : Biofuels, Bioproducts&Biorefining. Vol. 4 (2010); 359–361.
3. LI Yanqun, HORSMAN Mark, WU Nan, LAN Christopher y DUBOIS-CALERO Nathalie. Biofuels from microalgae. En :Biocatalysts and bioreactordesign : Biotechnologyprogress. Vol 24 (2008); 815-820.
4. GARIBAY Adriana, VÁZQUEZ Rafael, SÁNCHEZ María del Pilar, Serrana Leobardo y Martínez Alfredo. Biodiesel a partir de microalgas : Producción de microalgas. En :BioTecnología. Vol. 13, No.3 (2009); 38-61.
5. GERMAINAnney RAMÍREZ Miguel. Primera aproximación a las oportunidades y amenazas de los biocombustibles en Centroamérica. 1^{ra} edición. San Salvador:FUNDE, 2010. 58 p. ISBN 978-99923-920-1-0
6. CASTRO, Claudia; VALVERDE, María y PAREDES, Octavio. Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. En : Revista Ide@s CONCYTEG. Año 4 N° 54(diciembre, 2009); 1246-1270.
7. MATA Teresa, MATINS Alonso, CAETANO Nidia. Microalgae for biodiesel production and other applications:A review : processing and components extraction. En: Elsevier: Renewable and sustainable energy reviews. Vol. 14 (2010); 217-232.

8. EOL, Enciclopedia of life. [Base de datos en línea]. [Consultado el 12 de Jul. 2010]. Disponible en: - <http://www.eol.org/pages/911566>.
9. AlgaeBASE. [Base de datos en línea]. [Consultado el 15 de Feb. 2011]. Disponible en: www.algaebase.org/search
10. 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].
11. GONZÁLEZ Ángel, KAFAROV Viatcheslav y GUZMÁN Alexander. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. En :Prospect. Vol. 7, No. 2 (julio-diciembre 2009); 53-60.
12. BRENNAN Liam y OWENDE Philip. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels an co-products : Extraction and purification for algal metabolites. En : Elsevier : Renewable and sustainable energy reviews. Vol. 14 (2010); 557-577.
13. MOLINA, ACIÉN y ROBLES. Downstream processing of cell-mass and products. En :RICHMOND Amos *et al.* Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford :Blackwell Science Ltd.,2004.p. 215-251.
14. GONZÁLEZ, ÁngelDario. Desarrollo de una metodología para la extracción de aceites de microalgas empleando disrupción celular térmica y química. En : CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA CLAQ 2010 (49 : 2010 : Cartagena de Indias). Memorias del XXIX Congreso latinoamericanode química. Cartagena de Indias, 2010. p. 31.

15. LÓPEZ Lina y CÓRDOBA Luz Stella. Obtención de aceite de microalgas nativas mediante la combinación de disrupción celular y método de extracción soxhlet para la producción de biodiesel. Bucaramanga, 2010, 67 h. Trabajo de grado (Ingeniero químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de ingenierías físico-químicas. Escuela de Ingeniería química.
16. SARMIENTO, Ronald y AMAYA, Andrés. Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas con etanol/hexano empleando disrupción celular térmica y química. Bucaramanga, 2010, 50 h. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.
17. GALINDO, Leisly y GONZALEZ, Silvia. Adaptación del método Bligh&Dyera la extracción de lípidos de microalgas nativas para la producción de biodiesel. Bucaramanga, 2010, 66 h. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de ingeniería Química.
18. ANTHONY Renil. Solvent extraction of lipids from microalgae. Ohio, 2010, 101 h. Tesis (Maestro en Ciencias). Universidad de Ohio. Facultad de Russ College of Engineering and Technology. Departamento de ingeniería mecánica. Disponible en el catálogo bibliográfico de la universidad de Ohio: http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=ohiou1280854965
19. GARCÍA Jairo y MIRANDA Jesús. Comparación de métodos de extracción de aceite de microalgas a escala laboratorio para la producción de biodiesel. Bucaramanga, 2011, 63 h. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de ingeniería Química.
20. GONZALEZ Ángel. Protocolos de extracción de aceite de microalgas de bioprospección nacional. Laboratorio de biomasa. Universidad Industrial de Santander.

21. MERCK CHEMICALS. Fichas de datos de seguridad [en línea].
<http://www.merck-chemicals.com.co/fichas-de-datos-de-seguridad> [citado
en 31 de marzo de 2011].