

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA PARA LA EXTRACCIÓN DE
ACEITE DE MICROALGAS CON ETANOL/HEXANO EMPLEANDO
DISRUPCIÓN CELULAR TÉRMICA Y QUÍMICA**

RONALD JULIÁN SARMIENTO MARTÍNEZ

ANDRÉS ESTEBAN AMAYA RUÍZ

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

2010

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA PARA LA EXTRACCIÓN DE
ACEITE DE MICROALGAS CON ETANOL/HEXANO EMPLEANDO
DISRUPCIÓN CELULAR TÉRMICA Y QUÍMICA**

**RONALD JULIÁN SARMIENTO MARTÍNEZ
ANDRÉS ESTEBAN AMAYA RUÍZ**

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

Director

**VIATCHESLAV KAFAROV
Ingeniero Químico Dr. Sc.**

Codirectores

**ALEXANDER GUZMÁN
Químico, Ph.D.
Instituto Colombiano de Petróleo ICP**

**ANGEL DARIO GONZÁLEZ
Ingeniero Químico**

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

2010

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

- Ministerio de Agricultura y desarrollo rural, al Instituto Colombiano del Petróleo y al Instituto de Morrosquillo por el respaldo y financiamiento económico.
- Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov por su respaldo.
- Ing. Ángel Darío González, por su constante apoyo y orientación
- Grupo de investigación CIDES y al laboratorio de biomasa, por suministrar todos los materiales y equipos necesarios para el desarrollo de esta investigación.
- Universidad Industrial de Santander, por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales.
- Al personal del laboratorio de procesos por los servicios prestados
- Y en general a todos los que colaboraron de una u otra forma en la ejecución de este proyecto.

A Díos.

Por haberme permitido Alcanzar este logro.

A mí madre Elsa

*Por su apoyo incondicional, por sus consejos, sus valores, por la
motivación
constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más
que nada, por su amor.*

A mí padre Raúl.

*Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y
, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.*

A mis Hermanos

*Walter y Alonso por ser ejemplos a seguir y por su apoyo
incondicional*

*Y a la Universidad Industrial de Santander por permitirme ser
parte de una generación de triunfadores y gente productiva
para el país.*

¡Gracias a ustedes!

RONALD JULIÁN SARMIENTO MARTÍNEZ

*Al Señor Mario Bunge
Por enseñarme el valor de la crítica audaz.
Y a mi familia por su compañía y consejos.*

ANDRÉS ESTEBAN AMAYA RUIZ

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	17
1. MARCO TEÓRICO.....	19
1.1 Generalidades de las microalgas.....	19
1.1.1 Generalidades de la especie <i>Nannochloropsis</i>	22
1.2 Extracción de Lípidos de microalgas.....	22
1.2.1 Disrupción Celular.....	23
1.2.2 Método de extracción con Etanol-Hexano.....	24
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	26
2.1 Materia Prima.....	26
2.2 Reactivos y Equipos.....	26
2.2.1 Reactivos.....	26
2.2.2 Equipos.....	27
2.3 Pruebas Preliminares.....	27
2.4 Pretratamiento de la biomasa.....	28
2.4.1 Disrupción Celular.....	28
2.4.2 Disrupción Celular Térmica.....	29
2.4.3 Disrupción Celular Química.....	29
2.4.4 Organosolv Metanol/ácido.....	29
2.4.5 Filtrado, Lavado y secado de la biomasa pretratada.....	29
2.4.6 Extracción y Cuantificación de Lípidos.....	29
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	31
3.1 Pruebas Preliminares.....	31
3.2 Influencia de la humedad en la biomasa en la extracción de lípidos.....	33
3.3 Pretratamiento de la biomasa.....	35
3.3.1 Efecto del tiempo de autoclave.....	35
3.3.2 Efecto de la concentración de HCl.....	37
3.3.3 Pretratamiento Organosolv.....	39

3.4 Comparación de pretratamientos.....	40
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44
ANEXOS.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Células de <i>Nannochloropsis sp.</i>	22
Figura 2.	Procesos de disrupción celular.....	28
Figura 3.	Extracción de lípidos.....	30
Figura 4.	Células sin tratamiento.....	31
Figura 5.	Cambios causados en la células por diferentes reactivos...	32
Figura 6.	Rendimientos de extracción con biomasa húmeda y seca..	34
Figura 7.	Pérdidas por manipulación con biomasa húmeda.....	35
Figura 8.	Efecto del tiempo de autoclave sobre el porcentaje de recuperación de lípidos.....	36
Figura 9.	Pérdidas de biomasa por manipulación en tratamiento térmico.....	36
Figura 10.	Efecto de la concentración del HCl sobre el porcentaje de recuperación de lípidos.....	37
Figura 11.	Biomasa no recuperada en pretratamientos con HCl y Organosolv.....	39
Figura 12.	Comparación de pretratamientos.....	40
Figura 13.	Maceración y secado de la biomasa.....	47
Figura 14.	a) Lisis ácida con HCl b) Mezcla licor-biomasa pretratamiento organosolv.....	47
Figura 15.	a) y b) Filtración al vacío después de pretratamiento c) Licor de pretratamiento más agua de lavado.....	47
Figura 16.	a) Extracción con etanol b) Solución hidroalcohólica obtenida.....	48
Figura 17.	a) y b) Separación de la fase hidroalcohólica y hexánica...	48
Figura 18.	a) y b) Extractos lipídicos obtenidos.....	48
Figura 19.	a) Autoclave Esterilizadora Eléctrica b) Balanza analítica...	49
Figura 20.	a) Microscopio Lab II Nikon 100X b) Bomba de vacío.....	49
Figura 21.	a) Estufa para secado b) Plancha de agitación.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido lipídico de algunas especies de microalgas marinas y de agua dulce	20
Tabla 2. Comparación de las microalgas con otras materias primas para la producción de biodiesel	21
Tabla 3. Equipos Utilizados.....	27
Tabla 4. Composición química de la microalga <i>Nannochloropsis sp</i> ..	31
Tabla 5. Datos de la influencia de la humedad en la extracción de lípidos.....	34
Tabla 6. Datos obtenidos del pretratamiento con autoclave.....	36
Tabla 7. Datos obtenidos del pretratamiento con HCl.....	37
Tabla 8. Datos obtenidos del pretratamiento organosolv.....	39

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Metodología desarrollada para extracción de lípidos de microalgas	46
Anexo B. Principales etapas del proceso.....	47
Anexo C. Principales equipos utilizados.....	49
Anexo D. Reactivos Utilizados.....	50

RESUMEN

TITULO: DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA PARA LA EXTRACCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS CON ETANOL/HEXANO EMPLEANDO DISRUPCIÓN CELULAR TÉRMICA Y QUÍMICA*.

AUTORES: RONALD JULIAN SARMIENTO MARTÍNEZ, ANDRES ESTEBAN AMAYA R.**

PALABRAS CLAVE: Microalgas, disrupción celular, extracción, extracto lipídico.

DESCRIPCIÓN:

Este trabajo plantea el desarrollo de una metodología para la extracción de aceite a partir de microalgas como parte de la cadena de producción de biocombustibles de tercera generación. La biomasa de la microalga *Nannochloropsis sp* fue sometida a pretratamientos térmicos, químicos y organosolv, con el propósito de fraccionar la pared celular y posteriormente extraer el contenido lipídico con etanol y purificarlo con hexano.

El proceso de disrupción celular térmica seleccionado fue el autoclave, con tiempos de operación de 1 y 3 horas, a 121 °C y 15 psi. El tratamiento químico se basó en hidrólisis ácida con cuatro soluciones de HCl a concentraciones de 0,1 M, 0,5 M, 1 M y 3 M, durante un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente. También se empleó el pretratamiento Organosolv metanol/acido sulfúrico, con un tiempo de reacción de 4.1 h a 121°C y 15psi. La extracción del contenido lipídico se realizó en función de cada pretratamiento aplicado sobre la biomasa y se basó en la metodología de extracción con etanol y hexano propuesta por Ramírez Fajardo y colaboradores, a fin de evaluar los efectos causados sobre las células y cuantificar los extractos lipídicos obtenidos.

Los resultados muestran que los procesos de disrupción celular térmico y organosolv aumentaron los rendimientos de extracción respecto a la biomasa sin pre tratar, pero no superaron ninguno de los resultados obtenidos con lisis ácida. Una solución de HCl 0.5M resultó ser la más adecuada para el proceso de disrupción celular. Además se determinó que el contenido de agua en la biomasa pretratada, disminuye el rendimiento de los procesos de extracción debido a un descenso en la concentración del etanol durante la primera etapa de extracción del aceite crudo.

*Proyecto de Grado

**Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería Química. Director: Dr.Sc Viatcheslav Kafarov. Codirectores: Dr. Alexander Guzmán, Ing. Ángel González

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR MICROALGAE OIL EXTRACTION WITH ETHANOL/HEXANE USING THERMAL AND CHEMICAL CELL DISRUPTION*.

AUTHORS: RONALD JULIAN SARMIENTO MARTÍNEZ, ANDRES ESTEBAN AMAYA R.**

KEY WORDS: Microalgae, cell disruption, extraction, lipid extracts

DESCRIPTION:

This work proposes the development of a methodology for oil extraction from microalgae in third generation biofuels production chain. The biomass of the microalgae *Nannochloropsis sp* was subjected to thermal, chemical and organosolv pretreatments, in order to split the cell wall and then extract the lipid content with ethanol and purified with hexane.

The thermal cell disruption process chosen was autoclave with operation times of 1 and 3 hours at 121 ° C and 15 psi. The chemical treatment was based on acid hydrolysis with HCl solutions using four concentrations of 0.1M, 0.5M, 1M and 3M, for a time of 30 minutes at room temperature. Methanol / sulfuric acid organosolv pretreatment was also used with a reaction time of 4.1 hours at 121 ° C and 15psi. The extraction of the lipid content was carried out according to each pretreatment applied on biomass, and was based on the extraction methodology with ethanol and hexane proposed by Ramírez Fajardo et al., in order to evaluate the effects on the cells and quantifying lipid extracts obtained.

Is shown that the thermal and organosolv cell disruption process increases extraction yields for biomass without pretreatment, but these did not exceed any of the results obtained with acid hydrolysis. A 0.5M HCl solution proved to be the most suitable for cell disruption process. In addition it was determined that the water content in the pretreated biomass, decreases the efficiency of the extraction processes due to an ethanol dilution during the first stage of crude oil extraction.

* Undergrade Project

** Faculty of physical-chemical Engineerries. School of Chemical Engineering. Director: Dr.Sc Viatcheslav Kafarov. Codirectors: Dr. Alexander Guzmán, Ing. Ángel González

INTRODUCCIÓN

El incremento del precio del petróleo y las dificultades ambientales generadas por la utilización de combustibles fósiles, demandan urgentemente fuentes alternas de energía siendo una opción promisoría los biocombustibles. Estos ofrecen numerosos beneficios relacionados con la seguridad energética, la estabilidad de la economía y la reducción del impacto ambiental generado por los gases de efecto invernadero [1].

Los biocombustibles de primera generación derivados de cultivos terrestres tales como caña de azúcar, remolacha, maíz, soya etc., dan lugar a una enorme tensión en los mercados mundiales de alimentos y contribuyen a la escasez de agua. Los de segunda generación producidos a partir de materia prima lignocelulósica, afrontan los problemas mencionados anteriormente; sin embargo hay una gran preocupación por la competencia en el uso del suelo y los cambios provocados en él. Por lo tanto sobre la base de los conocimientos científicos actuales y las proyecciones de la tecnología, los biocombustibles de tercera generación derivados específicamente de microorganismos, son considerados como un recurso viable de energía que carece de los grandes inconvenientes asociados a los de primera y segunda generación. [2]

El uso de microalgas para la producción de biodiesel es una alternativa ventajosa debido al elevado contenido de lípidos y perfil idóneo de ácidos grasos que éstas ofrecen. Sumado a lo anterior, otros atributos de las microalgas son su elevada eficiencia fotosintética, su capacidad de crecer tanto en aguas marinas, dulces, residuales y salobres, así como su velocidad de crecimiento relativamente alta [3].

No obstante, la obtención de biodiesel a partir de microalgas presenta ciertas limitantes relacionadas con la escasez de información para su escalamiento, elevados costos de operación y la estandarización de métodos de extracción eficientes [4].

Ante este panorama y en el marco del proyecto “Bioprospección de microalgas Colombianas para la producción de biodiesel, Código 2008D32006-6710”, financiado por el Ministerio de Agricultura, y ejecutado por la alianza entre la Universidad Industrial de Santander, el instituto colombiano de petróleo ICP-ECOPETROL y la Corporación instituto de Morrosquillo, se propuso el desarrollo de una metodología a escala de laboratorio para la extracción de lípidos a partir de microalgas, realizando un estudio comparativo entre los procesos de disrupción celular térmica y química.

1. MARCO TEÓRICO

El calentamiento global y el agotamiento de los combustibles fósiles son uno de los principales problemas que afronta el mundo actualmente. Por lo tanto, la producción de biodiesel a partir de plantas, grasas animales y microalgas, ha sido propuesta como fuente de energía alternativa [5].

1.1 Generalidades de las microalgas

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariotas (cianobacterias) y eucariotas, que se localizan en diversos ambientes, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes [6]. Su biodiversidad es enorme, se han estimado más de 50.000 especies de las cuales, sólo un número alrededor de 30.000 han sido analizadas y estudiadas [7]. Se clasifican de acuerdo a varios parámetros tales como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular.

Desde hace mucho tiempo, las microalgas se han usado para diversos fines, pero en los últimos años han atraído la atención para la investigación de su potencial biotecnológico y se presentan como una alternativa que promete satisfacer o reemplazar la demanda global de petrodiesel [8]. Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas, corresponden a las microalgas verdes y a las diatomeas [9].

Las microalgas pueden proporcionar materia prima para diferentes tipos de combustibles renovables como el biodiesel, metano, hidrógeno, etanol etc. [10]. Estos microorganismos presentan ciertas ventajas respecto a otros cultivos energéticos entre las que se destacan, una alta velocidad de crecimiento, alta producción de biomasa, bajo uso de la tierra, utilización de terrenos no aptos para cultivos de producción alimenticia [11] y su

contenido de aceite en algunos casos supera el 80% en peso seco de biomasa, bajo condiciones de cultivo adecuadas (Tab.1) [12]. De hecho, tienen el mayor rendimiento de aceite frente a diversas fuentes de energía alternativa de origen vegetal (Tab.2) [13].

Tabla1. Contenido lipídico de algunas especies de microalgas marinas y de agua dulce [4].

Especies de Microalgas marinas y de agua dulce	Contenido total de Lipidos (% en peso seco de biomasa)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24-31
<i>Botriococcus braunii</i>	25-75
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6-39,8
<i>Chlorella emersonii</i>	25-63
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6-57,8
<i>Chlorella vulgaris</i>	5-58
<i>Chlorella sp</i>	10-48
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3
<i>Dunaliella sp</i>	17,5-67
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7-71,0
<i>Hemmatococcus pluvialis</i>	25
<i>Isochrysis galbana</i>	7-40
<i>Nannochloris sp</i>	20-56
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7-29,7
<i>Nannochloropsis sp</i>	12-53
<i>Neochloris oleabundans</i>	29-65
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18-57
<i>Porphyridium cruentum</i>	9-60,7
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-55
<i>Spirulina maxima</i>	4-9

Tabla 2. Comparación de las microalgas con otras materias primas para la producción de biodiesel [4].

Materia Prima	Contenido de aceite (% en peso seco de biomasa)	Rendimiento (L aceite/ha año)	Tierra usada (m² año/Kg biodiesel)
Maíz	44	172	66
Caña	33	363	31
Soya	18	636	18
girasol	40	1070	11
Palma	36	5366	2
Microalga*	30	58700	0,2
Microalga**	50	97800	0,1
Microalga***	70	136900	0,1

*Bajo contenido aceite; ** Medio contenido aceite; ***Alto contenido de aceite

Dependiendo de la especie, las microalgas producen diferentes tipos de lípidos, hidrocarburos y otros compuestos [14]. Los principales componentes de la fracción lipídica son triacilglicerol, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos y fosfolípidos [3]. No todos los aceites de algas son satisfactorios para la fabricación de biodiesel, pero la presencia de aceites adecuados es muy común y constituyen con frecuencia del 20% al 40% de los lípidos totales [12,15]. Sin embargo, su gran importancia está relacionada a la calidad de los ácidos grasos producidos, donde la mayoría de ellos se componen de ácidos grasos insaturados. Los triglicéridos son los más útiles para la fabricación de biodiesel [14].

La variación en el perfil de ácidos grasos entre los diferentes grupos de microalgas es considerable. Esto se debe principalmente a factores

nutricionales, ambientales, condiciones de cultivo y fases de crecimiento [14,15].

1.1.1 Generalidades de la especie *Nannochloropsis*:



Figura 1. Células de *Nannochloropsis* sp.

Nannochloropsis es una especie de microalga que se desarrolla en ambientes marinos. Las células son pequeñas (2-4 μm de diámetro), esféricas o ligeramente ovoides, no flageladas. Tienen un único cloroplasto sin pirenoide y que contiene varias bandas de laminillas fotosintéticas, cada una con tres

tilacoides por banda. La pared celular de *Nannochloropsis* está compuesta por capas microfibrilares de celulosa o xylan y mucilagos de polisacáridos amorfos. Las células no acumulan almidón. Esta microalga tiene un importante interés aplicado como fuente de ácidos grasos poliinsaturados, ya que acumula importantes cantidades de ácido eicosapentaenico [15].

1.2 Extracción de lípidos de microalgas

Químicamente, los lípidos son sustancias de origen biológico que siendo escasamente solubles en agua, pueden ser extraídas con solventes orgánicos de baja polaridad.

La producción de biodiesel a partir de microalgas implica la extracción de los lípidos desde la biomasa. Varios métodos para la extracción de estos metabolitos han sido propuestos, pero la extracción liquido-liquido o extracción con solventes es una de las técnicas más conocidas, por su

amplio uso en la extracción de aceites a partir de fuentes de origen animal y vegetal.

Estos procesos de extracción, implican la captación del disolvente por parte de la célula, provocando alteraciones en la membrana celular facilitando la circulación del contenido intracelular hacia el exterior. Las propiedades de la pared celular juegan un papel importante en este proceso ya que pueden impedir el contacto directo entre la célula y el disolvente disminuyendo los rendimientos de la extracción. Las propiedades fisiológicas tales como la ubicación y el proceso por el cual el contenido deseable se acumula en el interior de célula también puede afectar la eficacia del disolvente [16]. Los solventes orgánicos de mayor uso son el cloroformo, ciclohexano, acetona, etanol (96%v/v) y hexano. Sin embargo, este último es relativamente económico, presenta baja corrosividad, baja toxicidad [17], y es selectivo hacia los lípidos neutros ideales para la producción de biodiesel.

1.2.1 Disrupción celular

Los procesos clave implicados en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas son el cultivo, cosecha, extracción (disrupción celular) y la transesterificación de los lípidos. Aunque todos estos pasos son esenciales, la disrupción celular es particularmente importante ya que el rendimiento de los procesos de extracción está íntimamente relacionado con este paso [18].

La disrupción de las células se efectúa con el propósito de liberar los productos intracelulares de interés [19]. Se han propuesto diferentes métodos en función de las propiedades de la pared celular de las microalgas y de la naturaleza de los productos que desean obtenerse. La pared celular de estos microorganismos es robusta y está compuestas por

estructuras complejas (capas microfibrilares de polisacáridos amorfos, capas silicificadas o escamas calcificadas) [7] y en muchos casos son capaces de modular firmemente cualquier proceso de extracción [20].

Entre los métodos que han sido usados para tal fin se encuentran métodos físicos y químicos, como el ultrasonido, autoclave, Homogenizadores de alta presión, lisis ácida, lisis alcalina, y choque osmótico. [4].

1.2.2 Método de extracción con etanol-hexano.

Algunos procedimientos desarrollados para la extracción de aceite a partir de microalgas, involucran mezclas de solventes químicos con el objetivo de promover la formación de sistemas bifásicos, que faciliten la purificación de los extractos lipídicos. Es el caso del método propuesto por Ramírez Fajardo y colaboradores para la extracción de lípidos de la microalga *Phaeodactylum Tricornutum* [21].

Este método de extracción consiste fundamentalmente de dos pasos. Primero el etanol es usado para extraer los lípidos desde la biomasa. Aunque el etanol es un muy buen solvente también puede extraer algunos contaminantes celulares tales como azúcares, aminoácidos, sales, proteínas y pigmentos, que no son deseables durante la extracción del contenido lipídico [4].

El segundo paso consiste en la formación de un sistema bifásico, mediante la adición de agua y hexano al extracto de aceite crudo obtenido del primer paso. Un contenido de agua del 40%v/v mejora la recuperación de lípidos, evitando la formación de emulsiones que dificultan el proceso de extracción. De esta manera muchos de los lípidos son transferidos a la fase hexánica y la mayoría de las impurezas remanentes, permanecen en la fase hidroalcohólica. Este es un procedimiento alternativo a los métodos

tradicionales para la extracción de lípidos, que usan solventes de alta toxicidad. Además reduce la cantidad total de solvente utilizado. De esta manera es posible obtener hasta un 98% de la extracción cuantitativa de los ácidos grasos purificados [7].

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental desarrollada se divide en tres partes fundamentalmente. Pruebas Preliminares, Pretratamiento de la biomasa (disrupción celular) y Extracción de lípidos.

2.1 Materia Prima

La biomasa fue suministrada por el Instituto Morrosquillo (punta Bolivar, Colombia) bajo los códigos IM20091228-01 y IM20091203-11 correspondientes al género *Nannochloropsis sp*, y a una mixtura de *Navícula sp/ Scenedesmus sp* respectivamente, cultivadas en estanques abiertos, en medio enriquecido con agua de mar, cosechadas por floculación (150 ppm FeCl_3), y secadas al sol.

2.2 Reactivos y Equipos

2.2.1 Reactivos

Durante todo el proceso de experimentación se utilizó agua destilada y los siguientes reactivos:

- Etanol 99,8% v/v
- Hexano 98,5% v/v
- Ácido clorhídrico fumante 37% p/v
- Ácido Sulfúrico 97% v/v
- Metanol 99,8% v/v
- Cloroformo 99,4% v/v
- Hidróxido de sodio 85% v/v

2.2.1 Equipos

Tabla 3. Equipos Utilizados

Equipo	Descripción
Autoclave Esterilizadora Eléctrica	All American Modelo 25X con una presión máxima de 20 Psi y 259 °F
Balanza Analítica	Modelo XB220A, precisión $\pm 0,0001$ g
Estufa para secado	Serie ED 23 marca Binder
Microscopio	Lab II Nikon 100X
Bureta	25 mL graduada Silber Brand $\pm 0,045$
Erlenmeyer	150 ml SCHOTT PIREX
Embudo Büchner	Haldenwanger Berlín
Bomba de vacío	Emerson Modelo SA55NXGTE-4870 con una presión máxima de 100 PSIG
Plancha de Agitación Magnética	Wisestir MSH-20D

2.3 Pruebas preliminares

Se realizaron algunas pruebas preliminares utilizando una mezcla de los géneros *Navicula sp* y *Scenedesmus sp*, con el propósito de establecer cualitativamente el efecto provocado por agentes químicos sobre las células.

Se depositaron 5g de muestra en 4 recipientes de vidrio. A cada recipiente se le agregaron 100 mL de NaOH 0.5M, HCl 0.5M, Cloroformo grado analítico y Hexano grado analítico respectivamente y se sometieron a Autoclave durante 1 hora a 121°C y 15 psi. Luego se tomaron alícuotas de cada recipiente y se observaron bajo microscopía óptica a 100X. A fin de contrastar resultados se tomó una muestra de la mezcla, que no fue sometida a ningún tipo de tratamiento (control).

Paralelamente se realizaron pruebas de extracción de lípidos con biomasa húmeda y seca, a fin establecer el efecto del contenido de humedad en el

rendimiento de extracción. La metodología utilizada corresponde a la figura 3.

2.4 Pretratamiento de la biomasa

2.4.1 Disrupción celular

La figura 2 sintetiza los procesos de disrupción celular realizados sobre la microalga del género *Nannochloropsis sp.* La biomasa fue previamente macerada y secada a 105 °C durante 4 horas. Posteriormente se expuso a tres procesos de disrupción celular por separado: Térmico, químico y Organosolv (metanol/ácido). Se realizaron 2 replicas de cada experimento.

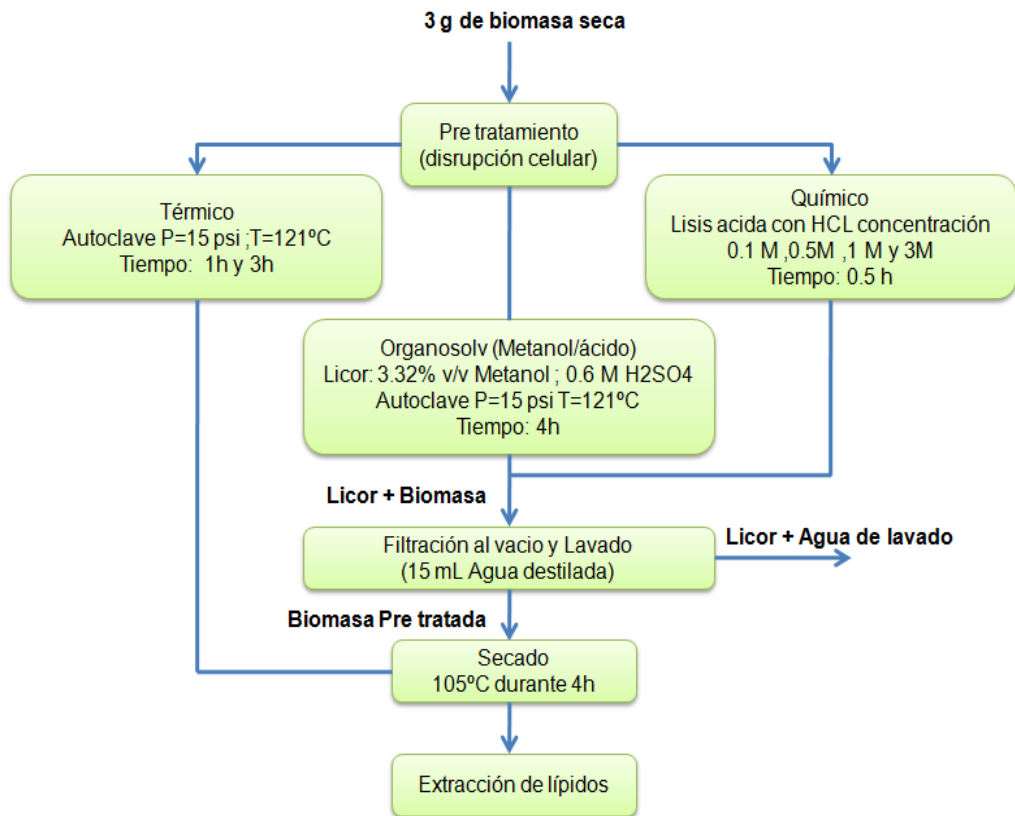


Figura 2. Procesos de disrupción celular

2.4.2 Disrupción celular térmica

Se sometieron 3 g de biomasa a un proceso de disrupción celular térmica en autoclave esterilizadora eléctrica a 15 psi y 121 °C durante un tiempo de 1h y 3h respectivamente.

2.4.3 Disrupción celular Química

Se trataron 3 g de biomasa con diferentes soluciones de HCl a concentraciones de 0,1 M, 0,5 M, 1M y 3 M con un tiempo de exposición de 0.5 horas, con agitación magnética a temperatura ambiente.

2.4.4 Organosolv Metanol/ácido

Paralelamente se aplicó el pretratamiento Organosolv Metanol-ácido propuesto para la obtención de azúcares reductores [22] con las siguientes condiciones: 3,32% v/v Metanol y 0,6 M de H₂SO₄ en solución y un tiempo de reacción de 4,1 h a 121°C y 15psi.

2.4.5 Filtrado, Lavado y secado de la biomasa Pre tratada

Finalizado el pre tratamiento, se separó la biomasa del licor por medio de filtración al vacío. La biomasa separada fue lavada con agua destilada y secada al horno a 105 °C durante 4 horas. Posteriormente se dio continuidad a la etapa de extracción.

2.4.6 Extracción y cuantificación de lípidos

La extracción y purificación de lípidos se basó en la metodología propuesta por Ramírez Fajardo y colaboradores [21], utilizando como solventes etanol

y hexano para extracción y purificación respectivamente. La figura 3 ilustra el método utilizado.

La cuantificación del extracto lipídico se determinó con el propósito de evaluar el rendimiento del proceso y obtener una medida indirecta del efecto causado por el pretratamiento sobre las células

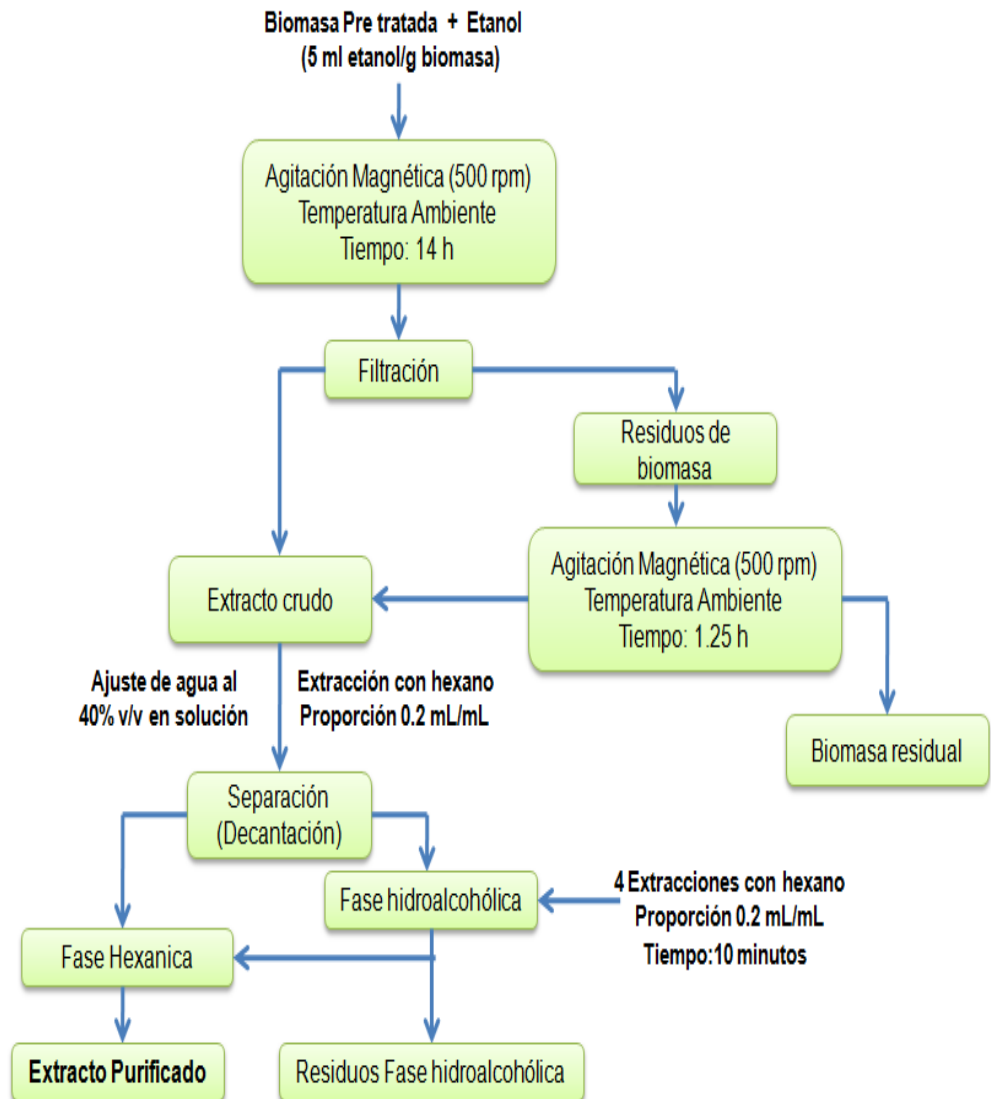


Figura 3. Extracción de lípidos

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

La composición química de la microalga *Nannochloropsis sp*, reportada por el instituto colombiano del petróleo (ICP) se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Composición química de la microalga *Nannochloropsis sp*.

Microalga	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)
<i>Nannochloropsis sp</i>	21,1	3,3	11,2	57,5

3.1 Pruebas Preliminares

La figura 5 muestran los cambios causados por el tratamiento con cloroformo, hexano, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico, sobre las células de los géneros *Navícula sp* y *Scenedesmus sp*.



Figura 4. Células sin tratamiento

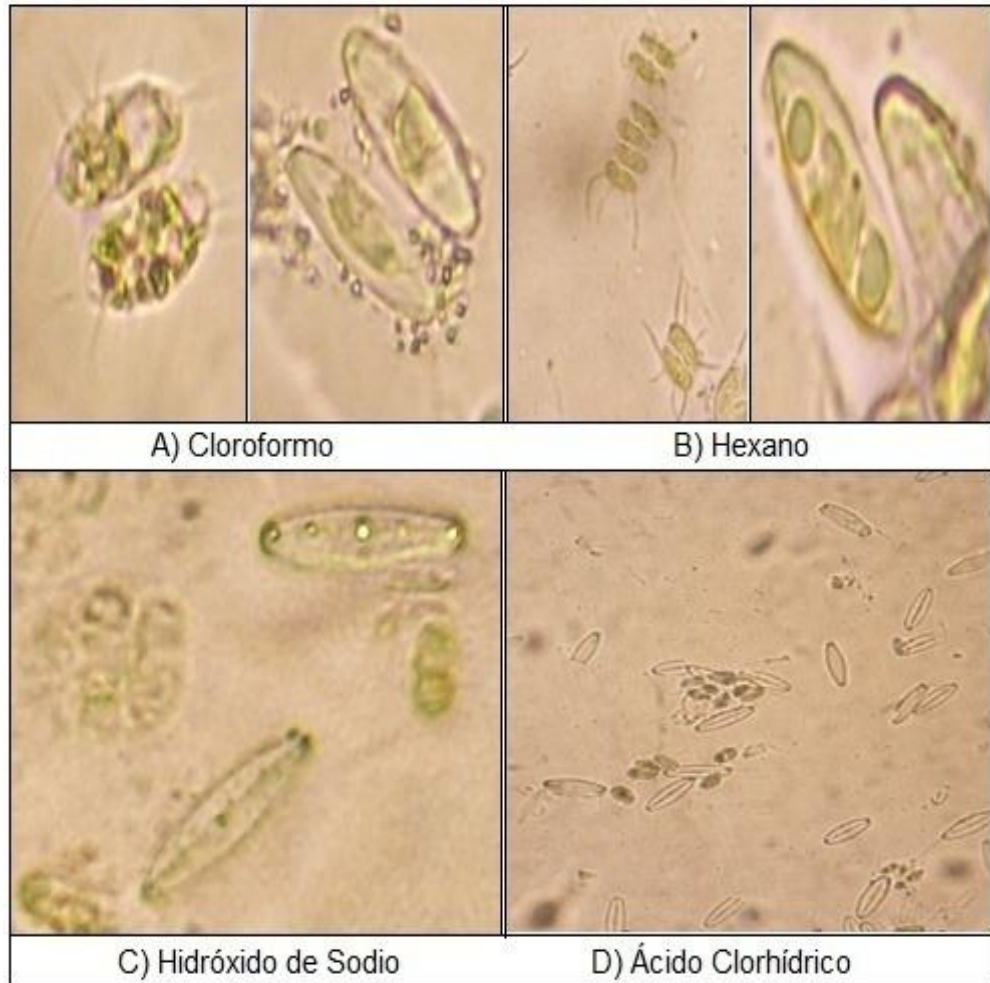


Figura 5. Cambios causados en la células por diferentes reactivos

Las alteraciones observadas sobre las células, en los tratamientos con hexano y cloroformo, corresponden a cambios en la coloración y deformación de la estructura interna. Aunque el cloroformo promovió la liberación de contenido intracelular en el género *Navicula* sp, los cambios a nivel morfológico y de valvas no fueron evidentes en ninguno de los dos tratamientos. Estas alteraciones evidencian la permeación del disolvente a través de la pared celular, pero no garantizan la liberación en gran proporción de los productos intracelulares deseados.

Por otro lado el tratamiento con ácido clorhídrico afectó morfológicamente algunas células, principalmente del género *Navícula sp*, provocando el rompimiento de valvas celulares. Se presentaron alteraciones en cuanto a la disposición de las colonias y la coloración, contenido intracelular disperso y desprendimiento de las proyecciones espinosas características del género *Scenedesmus sp*.

Los cambios causados por el ácido están relacionados con la hidrólisis de los polisacáridos que conforman la pared celular y la descomposición del material silíceo, que compone las valvas celulares de las diatomeas.

Por último las alteraciones causadas por el hidróxido de sodio comprenden un término medio entre las causadas por el ácido y los solventes orgánicos. Se presentaron cambios en la coloración y morfología de las células, pero no se evidencian efectos drásticos sobre la pared celular de las microalgas.

De acuerdo a los resultados cualitativos obtenidos y conociendo que la pared celular es una limitante en la extracción de lípidos, se decidió emplear ácido clorhídrico como agente para los procesos de disrupción celular química, ya que los efectos fueron más evidentes con dicho tratamiento y principalmente sobre el género *Navícula sp*.

3.2 Influencia de la humedad en la biomasa en extracción de lípidos.

La tabla 5 muestra los rendimientos obtenidos del proceso de extracción de lípidos empleando biomasa húmeda y seca. Estas pruebas se realizaron con una mixtura de *Navícula sp* y *Scenedesmus sp*.

Tabla 5. Datos de la influencia de la humedad en la extracción de lípidos

Pretratamiento	*Base húmeda (g)	Base seca (g)	Media de Extractos (g)	Desviación estándar	R (%)	P (%)
Húmeda	10	2,26	0,0337	0,0028	1,49	30,8
Seca	0	2,26	0,0629	0,0033	2,8	9,36

* 77,4% de humedad; R: rendimiento en base seca de biomasa; P: pérdidas

La figura 6 compara los rendimientos obtenidos con muestra húmeda y seca.

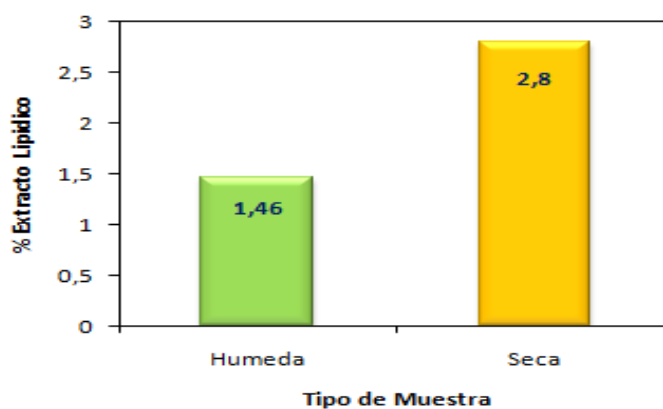


Figura 6. Rendimientos de extracción con biomasa húmeda y seca

Se observa que el contenido de agua en la muestra no es favorable para el proceso de extracción de lípidos debido principalmente a dos razones:

En primer lugar la presencia de agua en la muestra disminuye la concentración del etanol en la mezcla biomasa/solvente durante la primera etapa del proceso, reduciendo la eficiencia del disolvente en la extracción del aceite crudo. De la tabla anterior se observa que 10 g de biomasa húmeda contienen 7,74 g de agua. Esto provoca un descenso del 40% en la concentración del etanol disminuyendo así su capacidad extractiva.

En segundo lugar, las pérdidas reportadas reflejan que la presencia de humedad en la muestra dificulta su manipulación, principalmente por la

adhesión de la biomasa a los elementos y utensilios empleados durante cada etapa del proceso. Esto es un hecho desfavorable ya que una fracción de la biomasa no estaría siendo aprovechada para la extracción de lípidos.

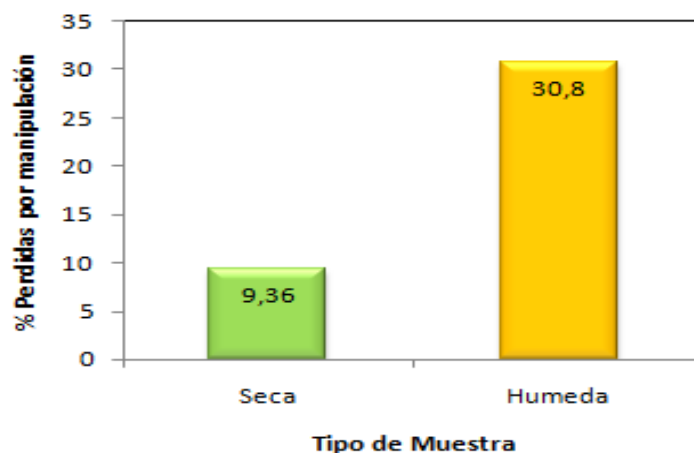


Figura 7. Pérdidas por manipulación con biomasa húmeda y seca

3.3 Pre tratamiento de la biomasa

La extracción del contenido lipídico se realizó en función de cada pre tratamiento aplicado sobre la biomasa del género *Nannochloropsis sp*, con el objetivo de plantear un estudio comparativo entre ellos y determinar el más efectivo.

3.3.1 Efecto del tiempo de autoclave

Los resultados obtenidos del pretratamiento térmico se muestran en la tabla 6. Aunque este proceso de disrupción celular mostró un aumento considerable respecto a la biomasa sin pre tratar en el porcentaje de recuperación de lípidos para un tiempo de 3 horas (Fig.8), no logró superar ninguno de los resultados obtenidos con los demás pretratamientos. Los porcentajes de recuperación correspondientes a los tiempos de autoclave trabajados no difieren en más del 1,2 % a pesar de incrementarse el tiempo

de exposición en 2 horas. Esto permite inferir que tiempos de operación superiores al máximo trabajado, representan un gasto energético elevado e innecesario.

Tabla 6. Datos obtenidos del Pretratamiento con Autoclave

Pretratamiento	Media de extractos (g)	Desviación estándar	R _L (%)	P (%)
Autoclave (1h)	0,0168	0,0004	4,9	9,46
Autoclave (3h)	0,0206	0,0015	6,07	9,35
Control	0,0098	0,0014	2,85	9,58

R_L: % Lípidos Recuperados respecto al total en la biomasa

P: Perdidas de biomasa por manipulación

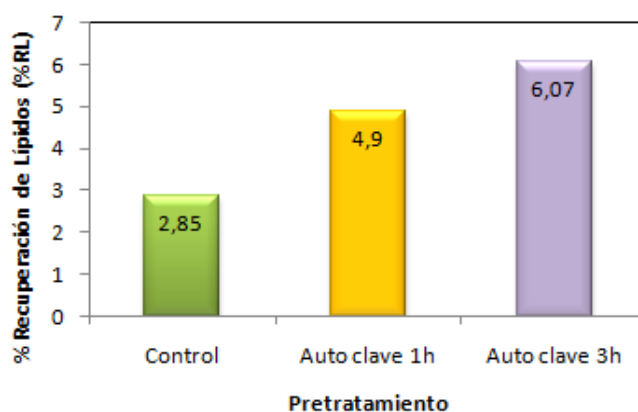


Figura 8. Efecto del tiempo de autoclave sobre el porcentaje de recuperación de lípidos

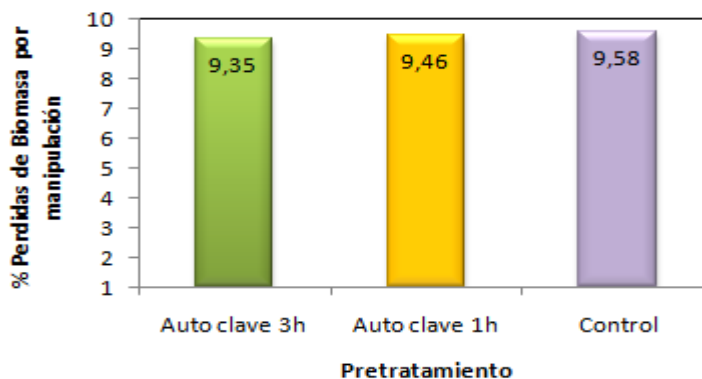


Figura 9. Pérdidas de biomasa por manipulación en tratamiento térmico

3.3.2 Efecto de la concentración de HCl

Se evaluaron los efectos de la concentración del ácido clorhídrico sobre el rendimiento de extracción a 0,1 M, 0,5 M, 1M y 3M (Tab. 7). De acuerdo a la figura 9 se observa que el rendimiento de extracción aumenta al incrementar la concentración del ácido en el rango establecido pero a concentraciones mayores a 0,5 M, este efecto es menos pronunciado con tendencia a estabilizarse.

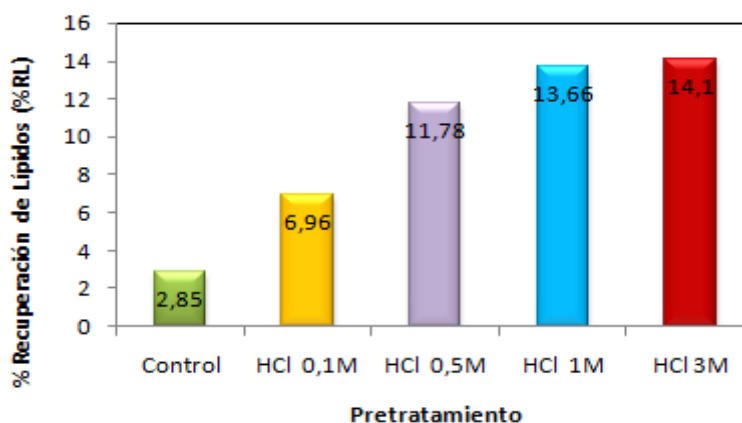


Figura 10. Efecto de la concentración del HCl sobre el porcentaje de recuperación de lípidos.

Tabla 7. Datos obtenidos del pretratamiento con HCl.

Pretratamiento	Media de extractos (g)	Desviación estándar	R _L (%)	B _N (%)
HCl 0.1 M 30 min. agitación	0,0233	0,0016	6,96	38,3
HCl 0.5 M 30 min. agitación	0,0398	0,0033	11,78	55,2
HCl 1 M 30 min. agitación	0,0463	0,0035	13,66	61,3
HCl 3 M 30 min. agitación	0,0478	0,0019	14,1	82,1

R_L: % Lípidos Recuperados respecto al total en la biomasa

B_N = % Biomasa no recuperada

La disrupción celular promovida con HCl a una concentración 3M, presentó el mayor porcentaje de recuperación de lípidos, con un 14,1% del total reportado en la tabla 4. Sin embargo trabajar a dicha concentración, implica la utilización de seis veces la cantidad de reactivo para incrementar muy poco el rendimiento, si se compara con el obtenido a una concentración 0,5 M del mismo ácido, correspondiente al 11,78%. Además, mayores concentraciones de ácido clorhídrico implican un aumento en los niveles de corrosión que pueden presentarse en los equipos involucrados durante todo el proceso. Por tanto, una solución de ácido clorhídrico 0,5 M resulta ser la más adecuada para el pre tratamiento de la biomasa, disminuyendo en un 250% el gasto de agente químico respecto a la concentración máxima trabajada, sin afectar drásticamente el rendimiento.

Los cambios causados por la lisis ácida sobre las células, no sólo son apreciable a través del porcentaje de recuperación de lípidos. Una variable que refleja esos cambios, es el porcentaje de biomasa no recuperada (Fig. 11). Se observa que cuando no se realiza tratamiento alguno sobre la biomasa (control) las pérdidas registradas son cercanas al 10% al igual que los tratamientos con autoclave donde la biomasa no sufrió cambios físicos notables (Fig. 9). Estas pérdidas pueden atribuirse a la manipulación de la muestra durante todo el proceso. Considerando que el hecho anterior es cierto, los altos porcentajes de biomasa no recuperada con tratamientos químicos corresponden a los componentes hidrosolubles presentes en las células, que abandonan el proceso (licor) durante la etapa de filtrado previa a la extracción de lípidos.

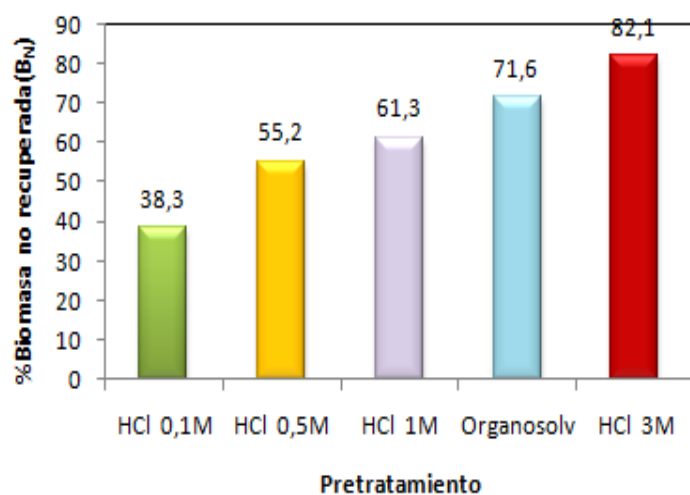


Figura 11. Biomasa no recuperada en pretratamientos con HCl y organosolv

3.3.3 Pretratamiento Organosolv

Aunque el pretratamiento organosolv aumentó el porcentaje de recuperación de lípidos en más de un 3% respecto al tratamiento térmico de 3 horas, no superó los resultados obtenidos con HCl a 0,5M. Sumado a lo anterior, este pretratamiento implica un gasto energético elevado, un tiempo de exposición mayor y la utilización de más sustancias químicas. Todo esto hace poco conveniente la utilización de este pretratamiento como método de disrupción celular previo a la extracción con etanol-hexano.

Tabla 8. Datos obtenidos del pretratamiento organosolv.

Pretratamiento	Media de extractos (g)	Desviación estándar	R _L (%)	B _N (%)
Organosolv	0,215	0,0079	9,55	71,6

R_L: % Lípidos Recuperados respecto al total en la biomasa

B_N = % Biomasa no recuperada

3.4 Comparación de pretratamientos

Los valores tomados por la variable respuesta (%RL), permiten apreciar claramente que el tratamiento químico con HCl a 0,5 M resultó ser el más adecuado en comparación con los pretratamientos térmico y organosolv utilizados (Fig.12). La síntesis de la metodología desarrollada para el procedimiento conjunto de ruptura celular y extracción de lípidos se muestra en el anexo A. Esta metodología de extracción presenta rendimientos menores en comparación con procedimientos tradicionales para la recuperación de lípidos, pero el producto obtenido está compuesto principalmente por lípidos neutros debido a la selectividad del hexano, siendo esta fracción la más adecuada para posteriores procesos de transesterificación.

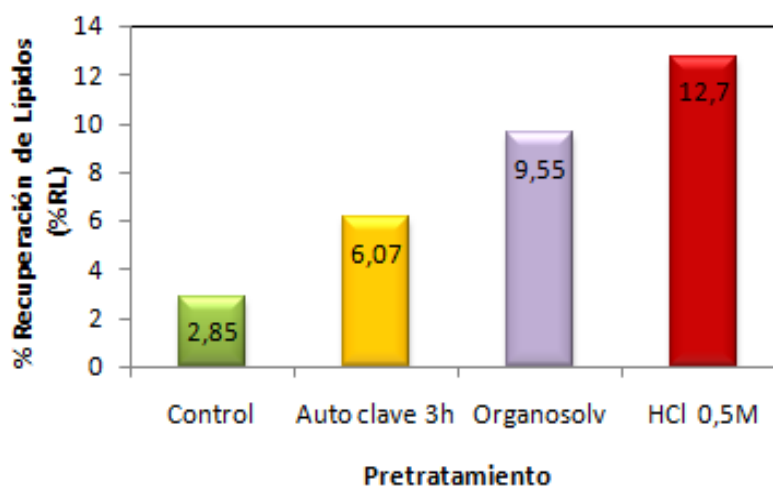


Figura 12. Comparación de pretratamientos

CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología para la extracción de aceite de microalgas utilizando biomasa del genero *Nannochloropsis sp.* Este proceso consistió de dos etapas principalmente: 1) Disrupción celular química con una solución de ácido clorhídrico 2) Extracción de lípidos con etanol/hexano basada en la metodología propuesta por Ramírez Fajardo y colaboradores.

El porcentaje de recuperación de lípidos aumentó al incrementar la concentración de ácido clorhídrico en el rango establecido, pero a concentraciones mayores a 0,5 M, este efecto es menos pronunciado con tendencia a estabilizarse. Una solución de HCl 0,5 M resultó ser la más adecuada para el proceso de disrupción celular, reduciendo hasta seis veces el consumo de reactivo respecto a la concentración máxima trabajada, sin afectar considerablemente el rendimiento de extracción.

El pretratamiento térmico mostró un aumento considerable en el porcentaje de recuperación de lípidos respecto a la biomasa sin pre tratar, pero no logró superar ninguno de los resultados obtenidos con los demás pretratamientos. Los porcentajes de recuperación correspondientes a los tiempos de autoclave trabajados no difieren en más del 1,2 % a pesar de incrementarse el tiempo de exposición en 2 horas. Un aumento en el tiempo de operación superior a tres horas representa un gasto energético innecesario.

El contenido de humedad en la muestra pretratada, no fue favorable para el proceso de extracción ya que disminuye la concentración del etanol, reduciendo así su capacidad extractiva. Por tanto se hace necesario secar la biomasa pre tratada antes del proceso de extracción de lípidos.

El pretratamiento organosolv aumentó el porcentaje de recuperación de lípidos en más de un 3% respecto al tratamiento térmico de 3 horas, pero no superó los resultados obtenidos con HCl a 0,5 M. Además, este pretratamiento implica un gasto energético elevado, un tiempo de exposición mayor y la utilización de más sustancias químicas que lo hacen poco conveniente para el proceso de disrupción celular previo a la extracción con etanol-hexano.

RECOMENDACIONES

Se recomienda estudiar la influencia del tiempo de exposición al ácido en el pretratamiento químico con el propósito de mejorar los rendimientos de extracción de lípidos.

Emplear la metodología desarrollada para la extracción de lípidos utilizando otras especies de microalgas en búsqueda de su estandarización.

BIBLIOGRAFIA

1. Hoekman SK. Biofuels in the U.S. e challenges and opportunities. *RenewEnergy* 2009; 34:14e22.
2. Nigam P, Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources 2010;1-17 .
3. Li Y, Wang B, Wu N, Lan CQ. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008;81(4):629–36.
4. Mata T, Martins A, Caetano N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010; 14: 217–232
5. Vasudevan, P.T., Briggs, M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J. Ind Microbiol. Biotechnol.* 2008;35:421-430.
6. Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* 2009;34(1):1–5.
7. Richmond A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* 2004: 7-17.
8. Garibay Hernández A, Vázquez-Duhalt R, Sánchez Saavedra M, Serrano Carreón L, Martínez Jiménez A. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*, 2009; 13 (3): 38-56
9. Arredondo BO & Vázquez-Duhalt R. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. 1991; 17: 99-111.
10. Harun R, Singh M, Forde G, Danquah M. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010; 14:1037–1047
11. Milne, T. A., Evans, R.J., Nagle, N. Catalytic conversion of microalgae and vegetable oils to premium gasoline, with shape-selective zeolites. *Biomass* 1990;21:219-232
12. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Advance.* 2007;25: 294-306

13. Sarmidi A. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*. 2009; 50: 1834–1840.
14. Pratoomyot J, Srivilas P, Noiraksar T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 2005;27(6): 1179–87.
15. Cohen Z. Products from microalgae. *In: Handbook of microalgal mass culture*. Richmond A (ed.) 1986: 421-454.
16. Amin Hejazi M, Wijffels RH. Milking of microalgae. *Trends in Biotechnology* 2004;22(4):189–94
17. Aryee A, Simpson B. Comparative studies on the yield and quality of solvent-extracted oil from salmon skin. *Journal of Food Engineering* 2009; 92: 353–358
18. Jae-Yon Lee, Chan Yoo, So-Young Jun, Chi-Yong Ahn, Hee-Mock Oh. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 2010;101: 75-77
19. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010; 14:557–577.
20. Sialve B, Bernet N, Bernard O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances* 2009;27(4):409–16.
21. Ramirez A, Cerdán L, Robles A, Ación F, Gonzalez P, Molina E. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007; 109: 120–126,
22. Meza A, Sepúlveda A. Estudio del pretratamiento metanol-ácido de la microalga *Chaetoceros gracilis* para la obtención de azúcares reductores totales. 2010:1-25

ANEXO A. METODOLOGÍA DESARROLLADA PARA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS

En un experimento típico

1. Macerar la biomasa recibida.
2. Secar la biomasa a 105 C durante 4 horas.
3. Pesar 3g de biomasa seca.
4. Adicionar a la biomasa previamente pesada en un vaso de precipitado, una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.5M en la proporción 10ml de solución/g de biomasa seca.
5. Agitar la mezcla durante 30 minutos a 500 rpm.
6. Filtrar la mezcla y lavar la biomasa con 15 mL de agua destilada, incorporar el agua de lavado al licor.
7. Secar la biomasa pre tratada a 105 C durante 4 horas.
8. Pesar la biomasa pre tratada para cuantificar componentes disueltos por el ácido.
9. Adicionar etanol Absoluto a la biomasa pretratada en proporción 5mL/g biomasa.
10. Agitar la mezcla durante 14 h a 500 rpm y temperatura ambiente.
11. Filtrar la mezcla obtenida.
12. Adicionar etanol a la biomasa residual en proporción 5mL/g biomasa.
13. Agitar la mezcla durante 1.25 h a 500 rpm y temperatura ambiente.
14. Filtrar la mezcla obtenida.
15. Ajustar el contenido de agua del extracto crudo al 40% v/v.
16. Adicionar Hexano a la solución hidroalcohólica obtenida de las extracciones con etanol en proporción 0.2mL/mL y agitar a 500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
17. Separar las fases por decantación.
18. Realizar 4 extracciones adicionales con hexano en proporción 0.2 mL/mL.
19. Secar la fase hexánica y cuantificar los extractos obtenidos

ANEXO B. PRINCIPALES ETAPAS DEL PROCESO

BIOMASA



Figura 13. Maceración y secado de la biomasa

PRETRATAMIENTO

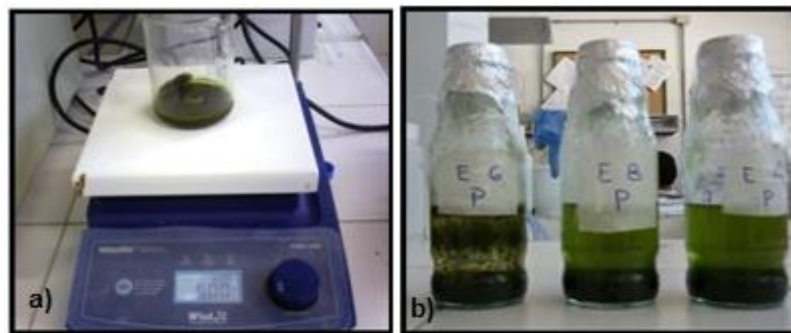


Figura 14. a) Lisis ácida con HCl b) Mezcla licor-biomasa pretratamiento organosolv

FILTRACIÓN

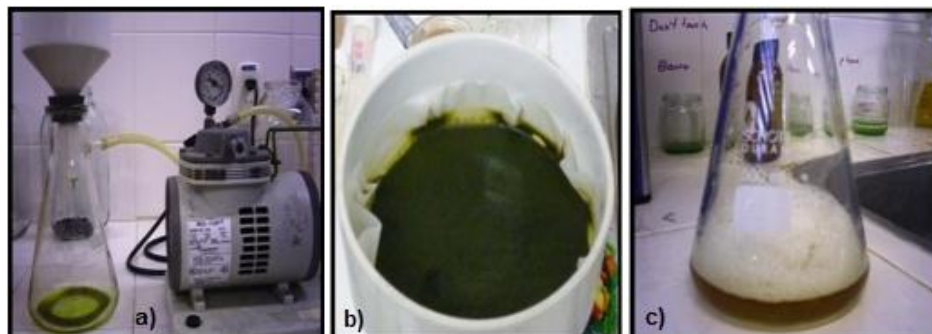


Figura 15. a) y b) Filtración al vacío después de pretratamiento c) Licor de pretratamiento mas agua de lavado

EXTRACCIÓN DE ACEITE CRUDO CON ETANOL

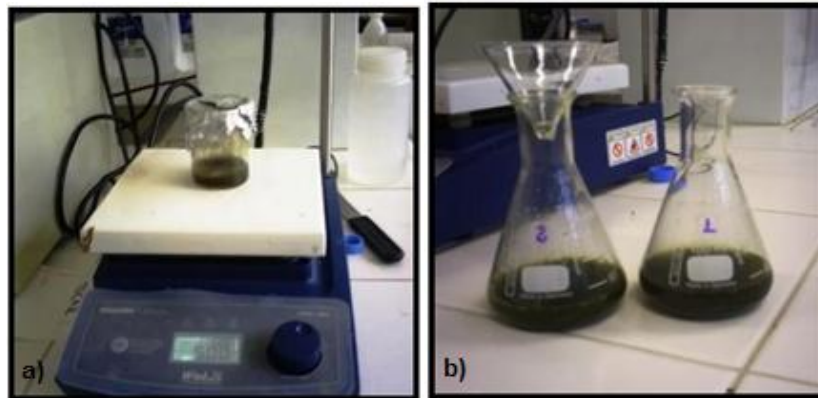


Figura 16. a) Extracción con etanol b) Solución hidroalcohólica obtenida

PURIFICACIÓN DE LIPIDOS CON HEXANO

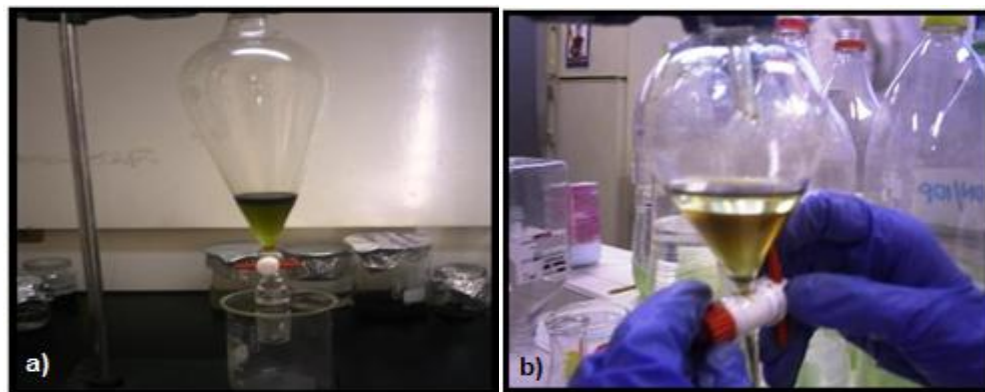


Figura 17. a) y b) Separación de la fase hidroalcohólica y hexánica

EXTRACTOS LIPÍDICOS PURIFICADOS

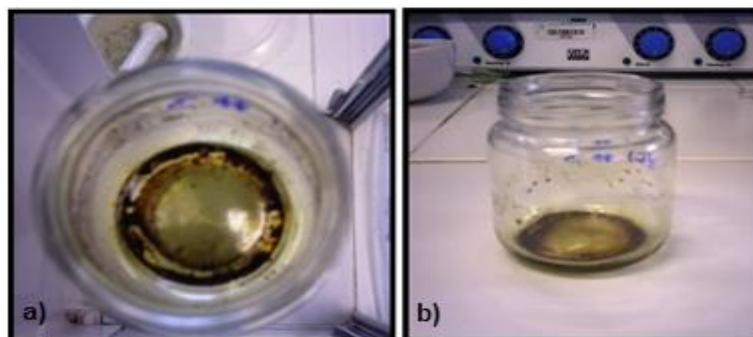


Figura 18. a) y b) Extractos lipídicos obtenidos

ANEXO C. PRINCIPALES EQUIPOS UTILIZADOS



Figura 19. a) Autoclave Esterilizadora Eléctrica b) Balanza analítica

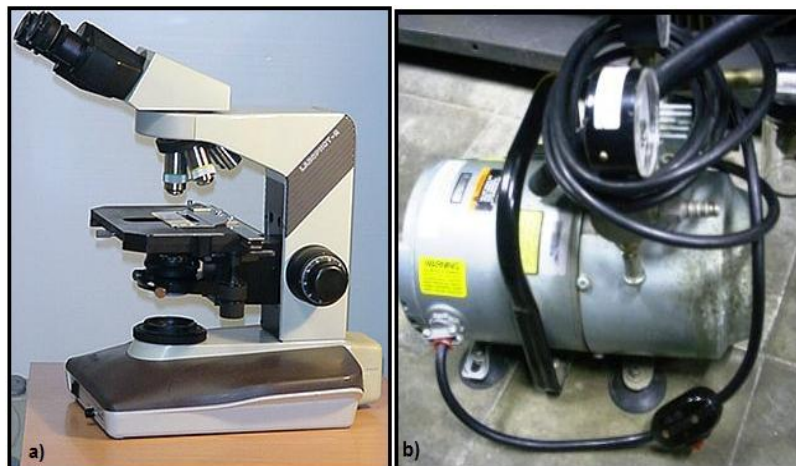


Figura 20. a) Microscopio Lab II Nikon 100X b) Bomba de vacío

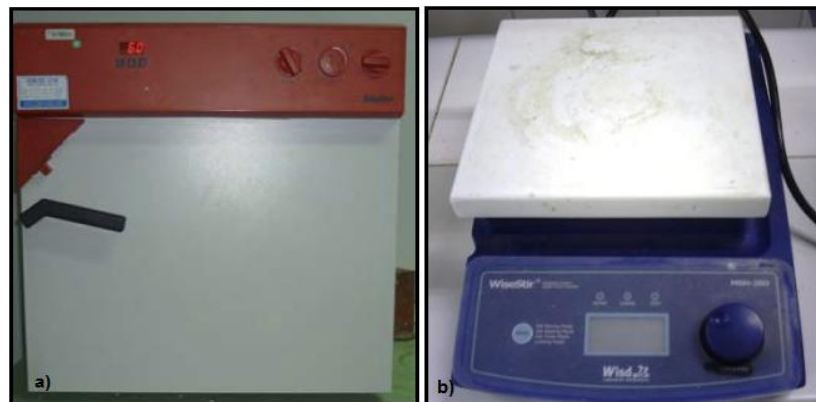


Figura 21. a) Estufa para secado b) Plancha de agitación magnética.

ANEXO D. REACTIVOS UTILIZADOS

REACTIVO	FORMULA MOLECULAR	INDICE DE POLARIDAD	PESO MOLECULAR (g/mol)	PUREZA
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	-	98,08	95-97 %v/v
Ácido Clorhídrico	HCl	-	36,5	37 %p/v
Etanol	C ₂ H ₆ O	5,2	46,07	99,8 %v/v
n-Hexano	C ₆ H ₁₄	0,0	86,18	98,5 %v/v
Hidróxido de sodio	NaOH	-	39,98	85 %v/v
Cloroformo	CHCl ₃	4,1	119,38	99,4 %v/v
Metanol	CH ₄ O	6,6	32,02	99,8 %v/v