

**EVALUACIÓN DE UNA METODOLOGIA PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS
EN BIOMASA HÚMEDA A PARTIR DE *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 Y
*Nannochloropsis Sp***

**NATHALY ANDREA MONTOYA TORRES
LUCIA AKIMUSHKIN VALENCIA**

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

2014

**EVALUACIÓN DE UNA METODOLOGIA PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS
EN BIOMASA HÚMEDA A PARTIR DE *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 Y
*Nannochloropsis Sp***

**NATHALY ANDREA MONTOYA TORRES
LUCIA AKIMUSHKIN VALENCIA**

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

Director

**VIATCHESLAV KAFAROV
Ingeniero Químico Dr. Sc**

Codirector

**PAOLA ANDREA SANGUINO BARAJAS
Ingeniera Química**

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

2014

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

Principalmente a Dios y a nuestros padres, que con grandes esfuerzos nos brindaron un apoyo incondicional para alcanzar esta meta.

DR. SC. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación CIDES y por su respaldo como director del proyecto.

INGENIERA PAOLA ANDREA SANGUINO BARAJAS, estudiante de maestría en ingeniería química por su constante colaboración y paciencia durante la ejecución de éste proyecto.

BIÓLOGO ANDRÉS BARAJAS por su orientación, comprensión y apoyo para contribuir al buen desarrollo del presente proyecto.

INGENIERO GUILLERMO ACERO, encargado de los laboratorios de investigación de ingeniería química, por su colaboración durante la ejecución de éste proyecto.

La Universidad Industrial de Santander, los profesores de ingeniería química que hicieron parte de nuestra formación profesional.

A Dios por darme sabiduría, entendimiento y fortaleza durante este largo camino, por levantarme y darme aliento en cada caída y enseñarme una valiosa lección detrás de cada una de ellas.

A mis padres por su apoyo aun cuando el camino se tornaba más complicado, pero en especial gracias a mi madre, la persona que no dudo ni un instante de mis capacidades y a pesar de todo jamás dejo de creer en mí. ¡Esto es para ti mami adorada!

A mis hermanos Gustavo, Sergio y Juan pablo, por su amor y apoyo en mi proceso de superación personal.

A mis amigos Sergio, Luisa, Javier, Eliza, Diana A, Issa, Johanna, Viviana, Lucía, Yese, Silvana, Daissy, Mafe, Roció, Poblador, Mónica, Claudio, Víctor que estuvieron presentes en los fracasos y victorias, quienes con sus buenas energías, oraciones, bromas, paseos y jornadas de estudio, hicieron más agradable este camino. A cada uno de ustedes mis mejores deseos y éxitos en su vida.

A mi gloriosa Selección UIS de Baloncesto femenino, Mafe, Maleja, Linda, Leslie, Diana, keidy, Alejandra, Erika, Lida, Laura y a mi entrenador Fabio Gómez, por tantos triunfos y derrotas, pero lo más importante, el haber vivido una de las mejores experiencias en mi paso por la universidad y poder contar con la amistad de tan maravillosas personas. Siempre con gran orgullo diré que fui parte del mejor equipo de la Universidad Industrial de Santander.

Nathaly Andrea Montoya Torres

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	18
1.1 MÉTODOS DE CULTIVO	19
1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	20
1.2.1 Método Sathish et al	20
1.2.2. Método Bligh and Dyer	21
1.3 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS	22
1.3.1. Extracción de lípidos con base en el método descrito por Sathish <i>et al.</i>	22
1.3.2 Método Bligh and Dyer	22
1.3.3. Determinación de la humedad	23
1.3.4. Cálculo de la eficiencia de extracción	23
1.3.5. Caracterización de lípidos	24
2. RESULTADOS Y ANALISIS	25
2.1 METODOLOGÍA CON BASE EN LO PROPUESTO POR SATHISH <i>ET AL.</i>	25
2.2. METODOLOGÍA CON BASE EN LO PROPUESTO POR BLIGH AND DYER.	27
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
2.3.1 Metodología según lo propuesto por Sathish et al.5	29
2.3.2 Metodología según lo propuesto por Bligh and Dyer.	31
2.4. ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LAS METODOLOGÍAS EVALUADAS (SATHISH <i>ET AL</i> Y BLIGH AND DYER).	33
2.5. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO LIPÍDICO	35
3. CONCLUSIONES	38
4. RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
BIBLIOGRAFÍA	46

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Metodología Experimental propuesta por Sathish et al	18
Figura 2. Metodología Experimental propuesta por Bligh And Dyer	19
Figura 1. Eficiencia de Extracción de lípidos de <i>Chlorella vulgaris</i>	25
Figura 2. Comparación de eficiencias de extracción de lípidos entre <i>Chlorella Vulgaris</i> y <i>Nannochloropsis Sp</i> utilizando biomasa húmeda	26
Figura 3. Eficiencia de Extracción de lípidos de <i>Chlorella Vulgaris</i>	28
Figura 4. Comparación de eficiencias de extracción de lípidos entre <i>Chlorella Vulgaris</i> y <i>Nannochloropsis Sp</i> utilizando biomasa húmeda	29
Figura 6. Diagrama de Pareto utilizando <i>Chlorella vulgaris</i> húmeda	30
Figura 7. Superficie de respuesta de extracción de lípidos utilizando <i>Chlorella vulgaris</i> húmeda	31
Figura 8. Diagrama de Pareto utilizando <i>Chlorella vulgaris</i> húmeda	32
Figura 9. Superficie de respuesta de extracción de lípidos utilizando <i>Chlorella vulgaris</i> húmeda	33
Figura 10. Comparación de métodos de extracción evaluados.	34

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Medio Bold Basal	20
Tabla 2. Diseño de experimental Sathish <i>et al.</i>	21
Tabla 3. Diseño de experimental Bligh And Dyer	21
Tabla 4. Contenido de lípidos de Microalgas	24
Tabla 5. Composición de ácidos grasos de <i>Chlorella Vulgaris</i> .	36
Tabla 6. Composición de ácidos grasos de <i>Nannochloropsis Sp.</i>	36

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. RESULTADOS DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS UTILIZANDO EL MÉTODO EMPLEADO POR SATHIS ET AL CON BIOMASA HÚMEDA.	51
ANEXO B. RESULTADOS DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS UTILIZANDO EL MÉTODO EMPLEADO POR BLIGH AND DYER CON BIOMASA HÚMEDA.	52
ANEXO C. RESULTADOS DE PRUEBAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA METODOLOGÍA DESCRITA POR ASHIK SATHISH ET AL EMPLEANDO BIOM	53
ANEXO D. RESULTADOS DE PRUEBAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA METODOLOGÍA DESCRITA POR BLIGH AND DYER <i>ET AL</i> EMPLEANDO BIOMASA HÚMEDA DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	55
ANEXO E. RESULTADOS DE PRUEBAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA METODOLOGÍA DESCRITA POR ASHIK SATHISH <i>ET AL</i> UTILIZANDO BIOMASA HÚMEDA DE <i>NANNOCHLOROPSIS SP</i>	57
ANEXO F. RESULTADOS DE PRUEBAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA METODOLOGÍA DESCRITA POR BLIGH AND DYER <i>ET AL</i> EMPLEANDO BIOMASA HÚMEDA DE <i>NANNOCHLOROPSIS SP</i>	59
ANEXO G. FOTOGRAFÍAS DEL PROCESO PARA EL DESARROLLO DE LAS METODOLOGÍAS PROPUESTAS.	61

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE UNA METODOLOGIA PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS EN BIOMASA HÚMEDA A PARTIR DE *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 Y *Nannochloropsis Sp**

AUTOR: NATHALY ANDREA MONTOYA TORRES, LUCIA AKIMUSHKIN VALENCIA**

PALABRAS CLAVE: LÍPIDOS, MICROALGAS, BIOMASA HÚMEDA, SOLVENTES DE EXTRACCIÓN.

DESCRIPCIÓN:

Los lípidos son sustancias de origen biológico constituidos por moléculas orgánicas, se caracterizan por su poca solubilidad en agua debido a que están formados por cadenas largas hidrocarbonadas, sin embargo son altamente solubles en solventes orgánicos como cloroformo, benceno, éter y hexano entre otros. Una alternativa interesante para la obtención de lípidos es la utilización de microalgas como fuente de extracción, estos microorganismos pueden almacenar cantidades importantes de metabolitos como proteínas de 40% a 50%, carbohidratos hasta 55% y lípidos de 20% a 30%. Para la extracción de lípidos provenientes de microalgas se han utilizado diferentes métodos con biomasa seca, entre ellos extracción con solventes químicos, siendo este un método rápido y eficiente que puede alcanzar un rendimiento de 98%. Dos de los solventes más utilizados son el hexano y el cloroformo quienes alcanzan rendimientos de extracción de 70% y 90% respectivamente. La utilización de biomasa húmeda en los procesos de extracción de lípidos es sumamente importante debido a la disminución de costos de secado, reduciendo hasta un 90% el gasto energético. El presente trabajo evaluó las metodologías propuestas por Sathish *et al* y Bligh and Dyer para la extracción de lípidos a partir de *Chlorella Vulgaris* y *Nannochloropsis Sp*, utilizando biomasa seca y húmeda. Lo anterior mediante la ejecución de los diseños experimentales obtenidos para cada una de las metodologías estudiadas. Las eficiencias de extracción de lípidos alcanzadas fueron superiores utilizando biomasa húmeda en ambas metodologías, para el método con base en lo propuesto por Bligh and Dyer se obtuvieron eficiencias hasta de 99% con *Chlorella Vulgaris* y 65% con *Nannochloropsis Sp*, por otra parte para el método con base en lo propuesto por Sathish *et al* se obtuvieron eficiencias de 18 % para *Chlorella Vulgaris* y 57% con *Nannochloropsis Sp*.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela Ingeniería Química. Director: Viatcheslav Kafarov, Ingeniero Químico Dr. Sc. Codirector: Paola Andrea Sanguino Barajas, Ingeniera Química

ABSTRACT

TITLE: EVALUACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS USANDO BIOMASA HÚMEDA DE *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 Y *Nannochloropsis Sp**

AUTHOR: NATHALY ANDREA MONTOYA TORRES, LUCIA AKIMUSHKINA VALENCIA**

KEYWORDS: LÍPIDOS, BIOMASA DE MICROALGAS HÚMEDA, EXTRACCIÓN CON SOLVENTES.

DESCRIPCIÓN:

Lípidos son sustancias de origen biológico constituidas por moléculas orgánicas, se caracterizan por su insolubilidad en agua porque están formados por largas cadenas de hidrocarburos, sin embargo tienen alta solubilidad en solventes orgánicos como cloroformo, benceno, éter y hexano. Una alternativa interesante para la extracción de lípidos es el uso de microalgas como fuente, ya que estos microorganismos pueden contener altas cantidades de metabolitos como proteínas entre 40 y 50%, carbohidratos 55%, y lípidos entre 20% y 30%. Para la extracción de lípidos de microalgas se han utilizado diferentes métodos con biomasa seca, el más popular es la extracción con solventes químicos debido a las altas eficiencias alcanzadas. Dos de los solventes más conocidos son el hexano y el cloroformo que alcanzan eficiencias del 70% y 90% respectivamente. El uso de biomasa húmeda en los procesos de extracción es muy importante debido a la disminución de los costos, que representan el 90% del costo total de la extracción de lípidos. Este trabajo evalúa las metodologías propuestas por Sathish *et al* y Bligh y Dyer para la extracción de lípidos usando biomasa húmeda de *Chlorella Vulgaris* y *Nannochloropsis Sp* a través del desarrollo de diseños experimentales para cada una. La extracción de lípidos siempre fue mayor usando biomasa húmeda. Con la metodología propuesta por Bligh y Dyer se alcanzó una máxima eficiencia del 99% usando *Chlorella Vulgaris* y del 65% usando *Nannochloropsis Sp*. Por otro lado, con la metodología propuesta por Sathish *et al* se alcanzó una máxima eficiencia del 18% usando *Chlorella Vulgaris* y del 57% usando *Nannochloropsis Sp*.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela Ingeniería Química. Director: Viatcheslav Kafarov, Ingeniero Químico Dr. Sc. Codirector: Paola Andrea Sanguino Barajas, Ingeniera Química

INTRODUCCIÓN

Los lípidos son sustancias de origen biológico constituidos por moléculas orgánicas (biomoléculas), se caracterizan por su poca o casi nula solubilidad en agua, debido a que están formados por cadenas largas hidrocarbonadas [1], sin embargo son altamente solubles en solventes orgánicos tales como cloroformo, benceno, éter y hexano entre otros. Estas sustancias cumplen diferentes funciones, constituyen reservas energéticas en los seres vivos y forman parte de las membranas celulares. También se utilizan en la fabricación de diferentes productos como alimentos, aceites y jabones entre otras aplicaciones industriales. Actualmente los lípidos han sido utilizados en la elaboración de nuevas fuentes de energía renovable como es el caso de los biocombustibles. Estos últimos cumplen un papel importante en el mercado, siendo una nueva alternativa potencial hacia el reemplazo de los combustibles fósiles [2].

Los lípidos se pueden clasificar en saponificables y no saponificables. Los primeros son hidrolizados en medio alcalino produciendo ácidos grasos, mientras que los segundos no experimentan la reacción ya mencionada. Los lípidos saponificables han sumado importancia en la industria debido a que se puede obtener sales alcalinas (jabón), ceras, grasas y aceites. Estos productos tienen una demanda significativa frente a los lípidos no saponificables (esteroides, aceites esenciales y vitaminas lipofílicas) [3]. Sin embargo el costo en el mercado de los productos obtenidos a partir de lípidos no saponificables resulta ser más atractivo y representa una mejor oportunidad de negocio [4].

Una alternativa interesante para la obtención de lípidos es la utilización de microalgas como fuente de extracción. Las microalgas presentan diversas ventajas, entre las cuales se encuentra un rápido crecimiento, gran tolerancia al medio de cultivo (agua no potable) [5,6] y altos contenidos de compuestos orgánicos. Estos microorganismos pueden acumular cantidades importantes de

metabolitos como, proteínas (40% a 50%), carbohidratos (55%) y lípidos (20% a 30%). Recientemente se ha utilizado el género *Chlorella Vulgaris* en la obtención de lípidos, debido a su contenido de metabolitos de aproximadamente 58% de su peso seco [7, 8,9]. Otra microalgas generalmente utilizadas ha sido *Nannochloropsis Sp*, cuyo contenido de metabolitos puede alcanzar cerca de 53% de su peso seco [10]. Estos porcentajes son más altos en comparación con otras fuentes de biomasa como palma, coco, mamón, y semilla de girasol [11].

En la extracción de lípidos provenientes de microalgas a nivel de laboratorio se han utilizado métodos de extracción con solventes químicos, choque osmótico, extracción con fluidos súper críticos, autoclavado, extracción con ultrasonido, extracción asistida con microondas, extracción mediante destrucción mecánica y transesterificación directa [12,13,14]. La extracción mediante solventes se ha caracterizado por ser un método rápido y eficiente, que evita la degradación de la biomasa, alcanzando hasta un 98% de rendimiento [15]. No obstante, el uso de solventes tiene ciertas desventajas, como la selectividad y la obtención de algunos productos no deseados como azúcares, aminoácidos, sales, proteínas y pigmentos hidrófobos [16]. Tradicionalmente, se han empleado diferentes tipos de solventes orgánicos en la extracción de lípidos a partir de biomasa de microalgas, entre los solventes más utilizados se encuentran el hexano y el etanol. Mediante una mezcla hexano-etanol, es posible extraer hasta el 98% de los ácidos grasos presentes en la biomasa. Los métodos de extracción con hexano han llegado a mostrar resultados interesantes, obteniendo hasta un 79.4 % de lípidos transesterificables [17]. La utilización de hexano presenta múltiples ventajas, tiene una menor toxicidad comparado con otros solventes, es relativamente económico, fácil de recuperar y tiene alta selectividad hacia los lípidos neutros, que pueden ser convertidos en biodiesel utilizando tecnologías ya existentes [18,19].

Otras metodologías basadas en solventes químicos, pueden llegar a ser selectivas para lípidos polares y no polares, esto se logra debido a la utilización de un

solvente apolar, en combinación con un solvente relativamente polar. Con base en estas propiedades se desarrollaron métodos utilizando la mezcla cloroformo-metanol (Bligh & Dyer), este método rápido y eficiente ha sido ampliamente utilizado para algunos tipos de biomasa [20,21].

Comúnmente, se ha utilizado biomasa seca en los procesos de extracción con solventes químicos, algunos solventes han logrado buenos resultados con biomasa húmeda, alcanzando hasta un 85% en la primera extracción [22, 23]. Recientemente se han realizado comparaciones entre los procesos de extracción con biomasa seca y húmeda, mediante balances de energía. En estos trabajos, se demostró que las etapas del secado de biomasa y extracción de lípidos consumen altas cantidades de energía [24]. El secado de la biomasa representa el 90% del gasto de energía total del proceso [25], por lo tanto, para disminuir el consumo de energía se hace necesario eliminar la etapa del secado. En este sentido, el escenario es propicio para estudiar alternativas de extracción de lípidos a partir de biomasa húmeda, teniendo en cuenta la influencia de otras variables en el rendimiento de los procesos. El presente trabajo evaluó las metodologías propuestas por Sathish *et al* [17] y Bligh and Dyer [26] para la extracción de lípidos a partir de *Chlorella Vulgaris* y *Nannochloropsis Sp*, utilizando biomasa seca y húmeda. Lo anterior mediante, la ejecución de los diseños experimentales obtenidos para cada una de las metodologías estudiadas.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

Se evaluaron dos metodologías empleando disrupción celular seguida de extracción con solventes. La primera metodología utilizada se basa en lo propuesto por Sathis *et al*, en la que se emplea hexano como solvente extractor. El diagrama de proceso de esta metodología se presenta en la figura 1. La segunda metodología se basa en lo propuesto por Bligh and Dyer donde se utiliza una mezcla cloroformo: metanol como solvente de extracción. El diagrama de proceso de esta metodología se muestra en la figura 2.

Figura 1. Metodología Experimental propuesta por Sathish et al

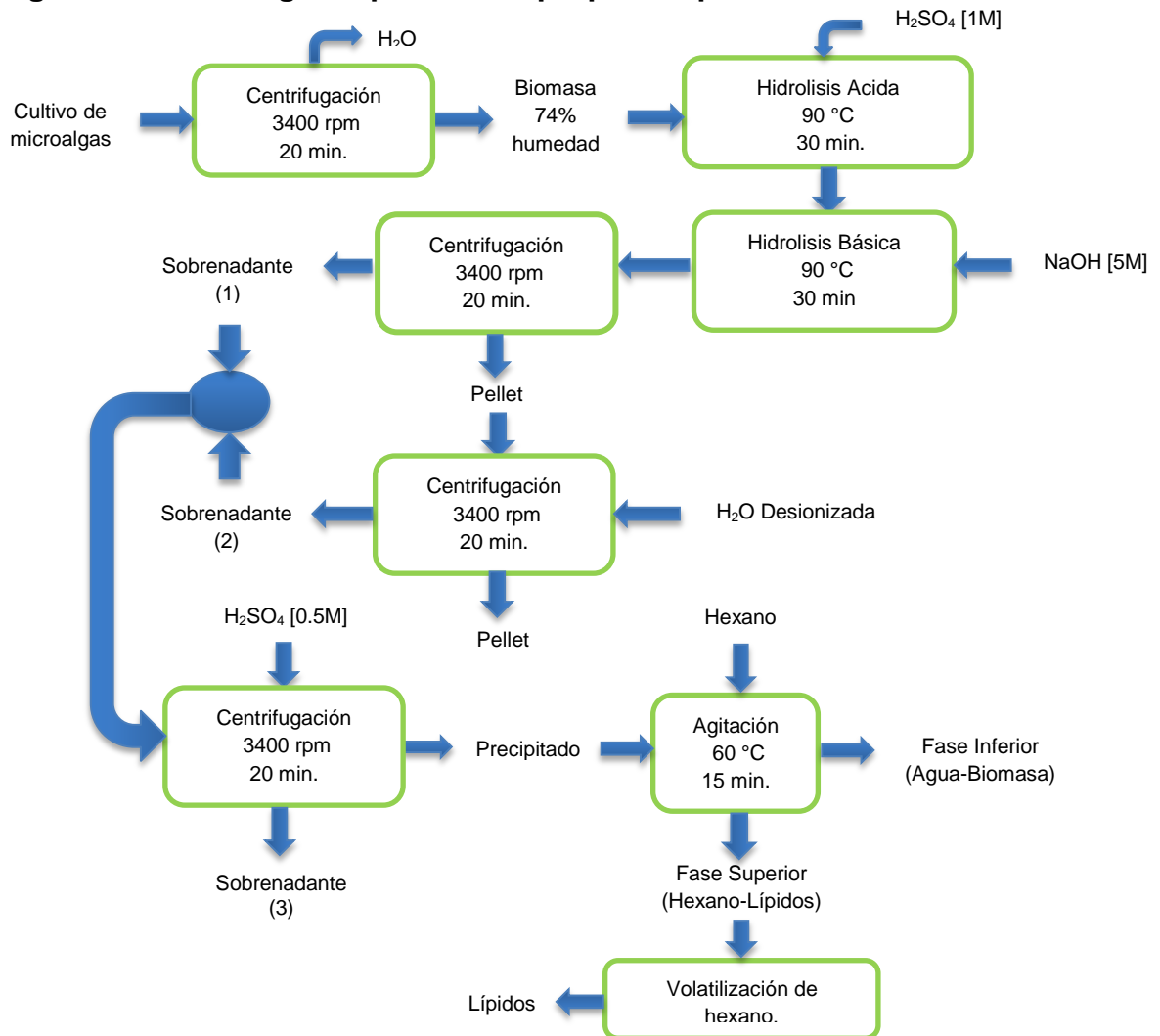
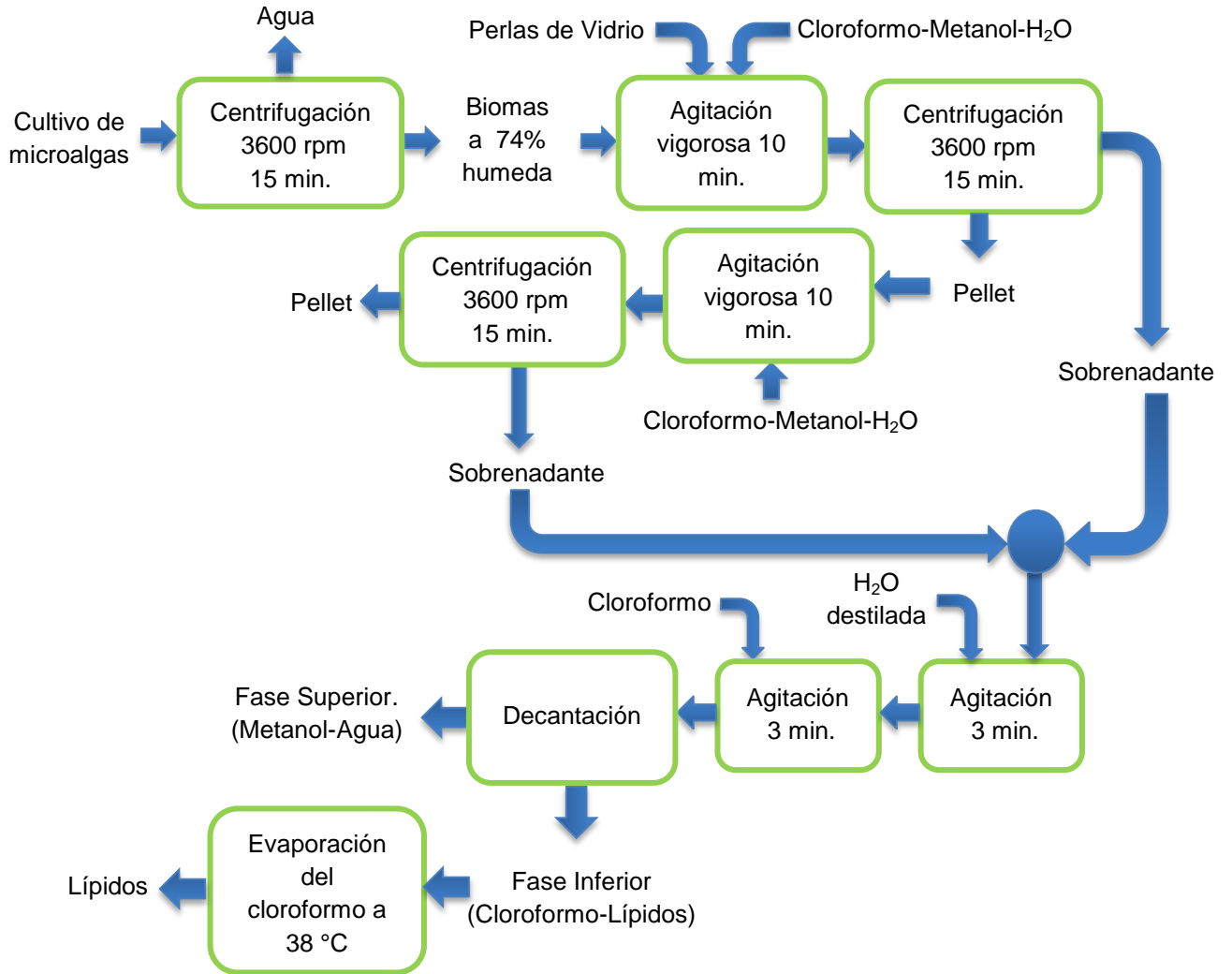


Figura 2. Metodología Experimental propuesta por Bligh And Dyer



s

1.1 MÉTODOS DE CULTIVO

Chlorella vulgaris UTEX 1803 y *Nannochloropsis Sp*, fueron adquiridas de la colección de cepas proveniente de la Universidad de Texas (Austin, Texas, USA); Inicialmente las cepas se cultivaron en medio Bold Basal (Tabla 1). Se utilizaron reactores rectangulares con un volumen de cultivo de 2.5 L. Los reactores se

acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo, ciclo luz-oscuridad 12:12 h, temperatura ambiente (23°C), pH neutro y sin ningún suministro complementario de CO₂. Después de 15 días de cultivo la biomasa fue recuperada mediante centrifugación a 3400 rpm durante 15 minutos en una centrífuga (UNIVERSAL 320 R).

Tabla 1. Medio Bold Basal

Compuesto	Composición (mg/L)	Compuesto	Composición (mg/L)
NaNO ₃	2,94	MoO ₃	4,93 X 10 ⁻³
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,04 X 10 ⁻¹	CuSO ₄ .5H ₂ O	6,29 X 10 ⁻³
NaCl	4,28 X 10 ⁻¹	Co (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1,68 X 10 ⁻³
K ₂ HPO ₄	4,31 X 10 ⁻¹	H ₃ BO ₃	1,85 X 10 ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,29	EDTA	1,71 X 10 ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,70 X 10 ⁻¹	KOH	5,53 X 10 ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,07 X 10 ⁻²	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,79 X 10 ⁻²
MnCl ₂ .4H ₂ O	7,28 X 10 ⁻³		

1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

1.2.1 Método Sathish et al. El diseño experimental de composición central 3³ con 17 pruebas, se realizó utilizando la herramienta informática STATISTIC 7.0. Las variables en consideración fueron relación biomasa/solvente y temperatura de solvente. En la Tabla 2 se presenta el diseño de experimentos.

Tabla 2. Diseño de experimental Sathish *et al.*

Prueba	Biomasa (g)	Temperatura (°C)	Volumen (ml)	Prueba	Biomasa (g)	Temperatura (°C)	Volumen (ml)
A	290,33	42.5	5	J	425	60	6.60
B	625	42.5	5	K	825	60	3.4
C	625	42.5	5	L	825	25	3.4
D	625	42.5	5	M	825	25	6.60
E	959.66	42.5	5	N	425	25	6.60
F	625	42.5	7.67	O	425	25	3.4
G	625	42.5	2.32	P	625	71.78	5
H	825	60	6.60	Q	625	13.21	5
I	425	60	3.4				

1.2.2. Método Bligh and Dyer. El diseño experimental de composición central 4^3 con 27 pruebas, se realizó utilizando la herramienta informática STATISTIC 7.0. Las variables en consideración fueron relación biomasa/solvente y la concentración de la solución extractora (relación de los componentes de la solución extractora). En la Tabla 3 se presenta el diseño de experimentos.

Tabla 3. Diseño de experimental Bligh And Dyer

Prueba	Biomasa/Ste (g/L)	Relación Metanol:Cloroformo:H ₂ O	Prueba	Biomasa/Ste (g/L)	Relación Metanol:Cloroformo:H ₂ O
A	5	8:0,25:0,2	M	5	0,5:4:3,2
B	15	8:0,25:0,2	N	15	0,5:4:3,2
C	5	8:0,25:3,2	O	5	04:00,2
D	15	8:0,25:3,2	P	15	04:00,2
E	5	0,5:0,25:0,2	Q	5	0,5:4:0,2
F	15	0,5:0,25:0,2	R	15	0,5:4:0,2
G	5	0,5:0,25:3,2	S	10	9.5:1:0,8
H	15	0,5:0,25:3,2	T	10	01:00,8
I	20	01:00,8	U	10	02:01:00
J	10	01:00,8	V	10	01:03,8
K	5	04:03,2	W	10	2:4.75:0,8
L	15	04:03,2			

1.3 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

1.3.1. Extracción de lípidos con base en el método descrito por Sathish *et al.*

A un tubo falcón de 25 ml se adicionó biomasa húmeda de acuerdo al diseño de experimentos de la tabla 1, posteriormente se le adicionó 1 ml de H₂SO₄ 1M y se calentó a 90 °C durante 30 minutos. Seguidamente se le adicionó 1 ml de NaOH 5M y se calentó a 90 °C durante 30 minutos. Se dejó a temperatura ambiente y se centrifugó a 3400 rpm durante 20 minutos, para separar la fase sólida de la acuosa. La fase acuosa se transfirió a un tubo falcón de 25 ml y se dejó almacenada con el nombre corriente I. Seguidamente, a la fase sólida se le adicionó 1 ml de H₂O desionizada y se centrifugó a 3400 rpm durante 20 minutos, para lograr una nueva separación de fases. La fase acuosa se transfirió a la corriente I y se adicionaron 3 ml de H₂SO₄ 5M. La mezcla obtenida, se centrifugó a 3400 rpm durante 20 minutos. El sólido obtenido se transfirió a un tubo de vidrio de 25 ml, donde se adicionó un volumen de hexano de acuerdo al diseño de experimentos de la tabla 1. Luego la muestra se calentó a la temperatura indicada en la tabla 1, durante 15 minutos. La muestra se dejó a temperatura ambiente por un periodo de 12 horas para asegurar la separación de las fases. La fase superior (hexano-lípidos) se transfirió a cajas Petri previamente pesadas y se llevó a la cámara de extracción donde ocurrió la volatilización del hexano. Finalmente, las muestras se llevaron al desecador hasta alcanzar peso contante y se determinó la cantidad de extractos lipídicos por gravimetría (Ashik Sathish, Ronald C. Sims, 2012) [17].

1.3.2 Método Bligh and Dyer. A un tubo falcón de 50 ml se le adicionó biomasa húmeda de acuerdo al diseño de experimentos presentado en la tabla 2. Seguidamente, se le adicionaron 5.7 ml de solución Bligh and Dyer con las proporciones indicadas en la tabla 2 y 5 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. La mezcla se homogenizó con vórtex durante 10 minutos y se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se almacenó en tubos de vidrio

de 50 ml y al sólido obtenido, nuevamente se le adicionaron 5.7 ml de solución Bligh and Dyer con las proporciones indicadas en la tabla 2. La mezcla se homogenizó con vórtex durante 7 minutos y se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos. Los dos sobrenadantes se mezclaron en los tubos de vidrio y se agregaron 3 ml de agua destilada, la mezcla se homogenizó por tres minutos. Posteriormente, se adicionaron 3 ml cloroformo y se homogenizó nuevamente con vórtex por tres minutos. La mezcla se dejó a temperatura ambiente por un período de 24 horas para permitir la separación de las fases (agua y cloroformo-lípidos). La fase cloroformo-lípidos se transfirió a cajas Petri previamente pesadas y fueron llevadas a la cámara de extracción para permitir la volatilización del cloroformo. Finalmente, se llevaron al desecador hasta alcanzar peso constante y se determinó la cantidad de extracto lipídico por gravimetría. (Bligh and Dyer modificado, 2013)[26]

1.3.3. Determinación de la humedad. Se tomó 0.1 g de biomasa húmeda de microalgas y se llevó a papel filtro previamente pesado. La muestra se secó en el horno durante 24 horas a una temperatura de 100 °C. Posteriormente se llevó al desecador hasta alcanzar peso constante, y se determinó la pérdida de agua por gravimetría.

1.3.4. Cálculo de la eficiencia de extracción. Teniendo en cuenta el contenido de lípidos para cada una de las microalgas utilizadas como se muestra en la tabla 4, se calculó la eficiencia de extracción para cada uno de los métodos evaluados siguiendo la ecuación (1).

Tabla 4. Contenido de lípidos de Microalgas

Microalga	Lípidos (% En peso seco)
<i>Chlorella vulgaris</i>	15*
<i>Nannochloropsis Sp</i>	23**

Fuente: [27] [28]*, [29] **

$$\%Eficiencia\ de\ Extracción = \frac{Lípidos\ Experimentales\ g}{Lípidos\ teóricos\ g} * 100\%$$

Ecuación (1)

Una vez obtenidos los resultados de las eficiencias de extracción de lípidos a partir de *Chlorella vulgaris*, se seleccionaron las pruebas con mayor rendimiento para realizarlas utilizando *Nannochloropsis Sp* húmeda. Lo anterior con el objetivo de comparar la eficiencia de extracción en estos tipos de microalgas.

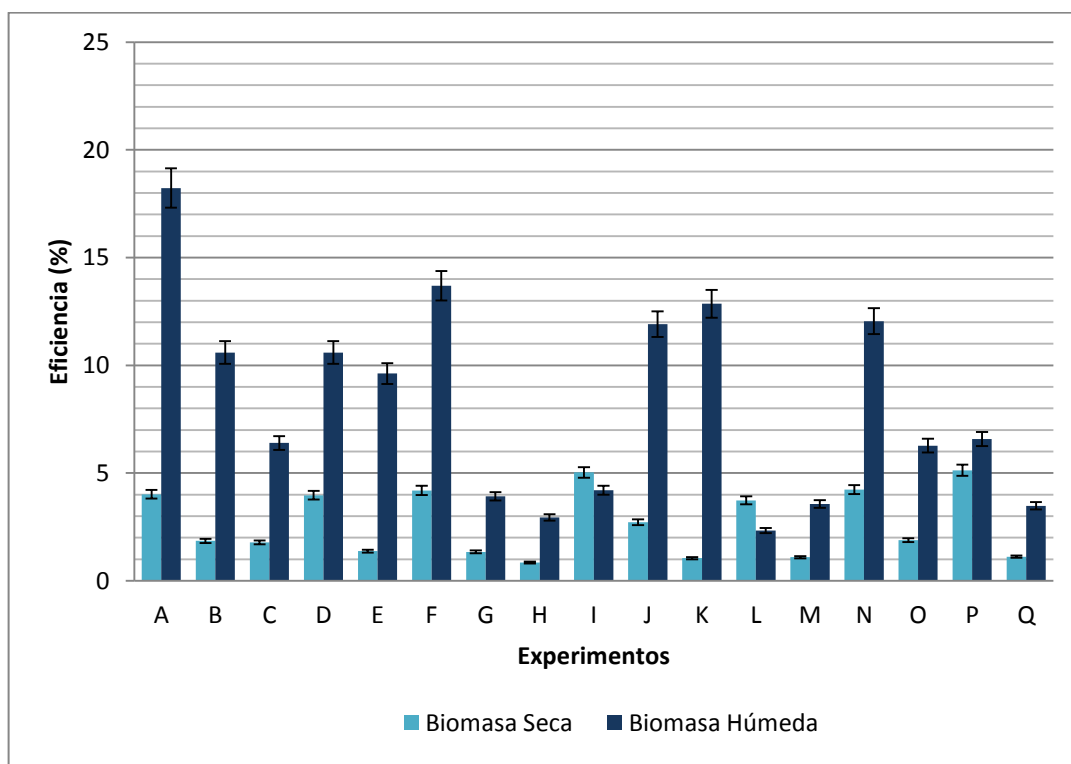
1.3.5. Caracterización de lípidos. Los extractos lipídicos que alcanzaron un mayor peso fueron enviados al laboratorio de alimentos CICTA, para cuantificar los ácidos grasos presentes. Para esto se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de ionización en llama (GC-FID), según las normas NTC 4967 y NTC 5013 (“*Grasas y aceites animales y vegetales, Preparación y análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por Cromatografía de gases*”).

2. RESULTADOS Y ANALISIS

2.1 METODOLOGÍA CON BASE EN LO PROPUESTO POR SATHISH *ET AL.*

Utilizando la metodología descrita por Sathish *et al* [17] y teniendo en cuenta el diseño de experimentos de la tabla 2, se calculó la eficiencia de extracción de lípidos a partir de biomasa (seca y húmeda) de *Chlorella Vulgaris*. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 1.

Figura 1. Eficiencia de Extracción de lípidos de *Chlorella vulgaris*



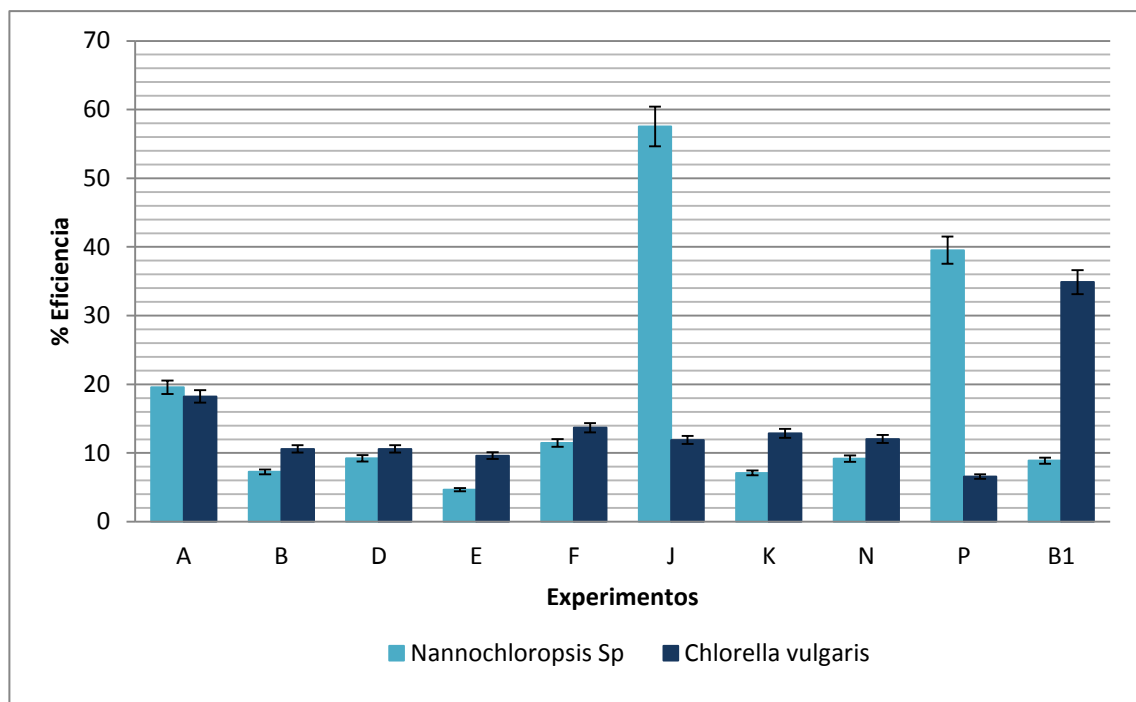
Como se muestra en la figura 1, gran parte de las pruebas alcanzó una mayor eficiencia de extracción de lípidos a partir de biomasa húmeda. Algunos autores han presentado resultados superiores utilizando biomasa húmeda mediante

extracción con otros solventes. Jones *et al* [30] realizó extracciones con 2-etoxi etanol en biomasa seca y húmeda y obtuvo una cantidad final de lípidos dos veces mayor en húmedo.

El mayor porcentaje de eficiencia de extracción de lípidos se obtuvo a condiciones de 42,5 °C y relación biomasa/solvente de 15,73 g/L correspondiente al experimento A, que alcanzó un 18,22% de eficiencia.

Una vez obtenidos los resultados de las eficiencias de extracción de lípidos a partir de *Chlorella vulgaris*, se seleccionaron las pruebas con mayor eficiencia para realizarlas utilizando *Nannochloropsis Sp* húmeda. Se compararon las eficiencias de extracción de lípidos de estas dos microalgas. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 2.

Figura 2. Comparación de eficiencias de extracción de lípidos entre *Chlorella Vulgaris* y *Nannochloropsis Sp* utilizando biomasa húmeda



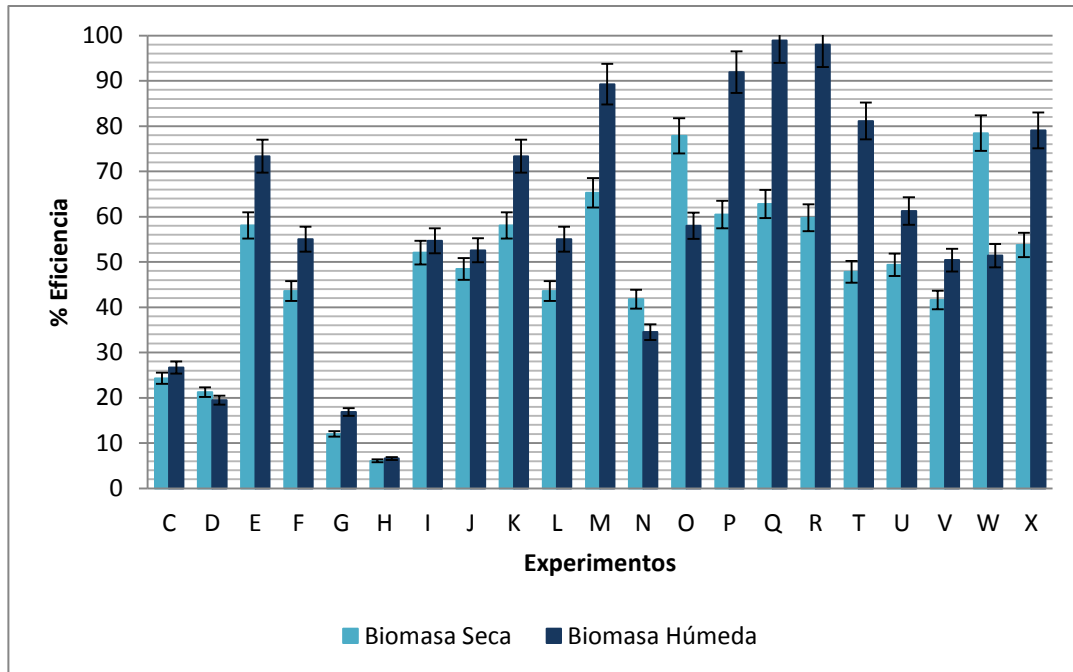
En la mayoría de los casos se observa una mayor eficiencia de extracción en *Chlorella Vulgaris*. Serrano Bermúdez [31] alcanzó a obtener una eficiencia de 45% utilizando *Chlorella vulgaris* y 25% utilizando *Nannochloropsis Sp.*

Los experimentos J y P presentaron mayor eficiencia en *Nannochloropsis Sp* alcanzando valores de eficiencia de 16,93% y 11,63% respectivamente. Esto puede obedecer a la influencia de la temperatura del solvente sobre la extracción, como lo muestran Shin *et al* (2014) [32]. Los autores aseguran que una mayor temperatura del solvente (cerca al punto crítico) conduce a valores de eficiencia más altos. De acuerdo a los resultados de la figura 2 se logra alcanzar una eficiencia de 16.93% a condiciones de 60 °C y relación biomasa/solvente de 16,92 g/L, correspondiente a la prueba J.

2.2. METODOLOGÍA CON BASE EN LO PROPUESTO POR BLIGH AND DYER.

Utilizando la metodología descrita por Bligh and Dyer [26] y teniendo en cuenta el diseño de experimentos de la Tabla 3, se calculó la eficiencia de extracción de lípidos a partir de biomasa (seca y húmeda) de *Chlorella Vulgaris*. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 3.

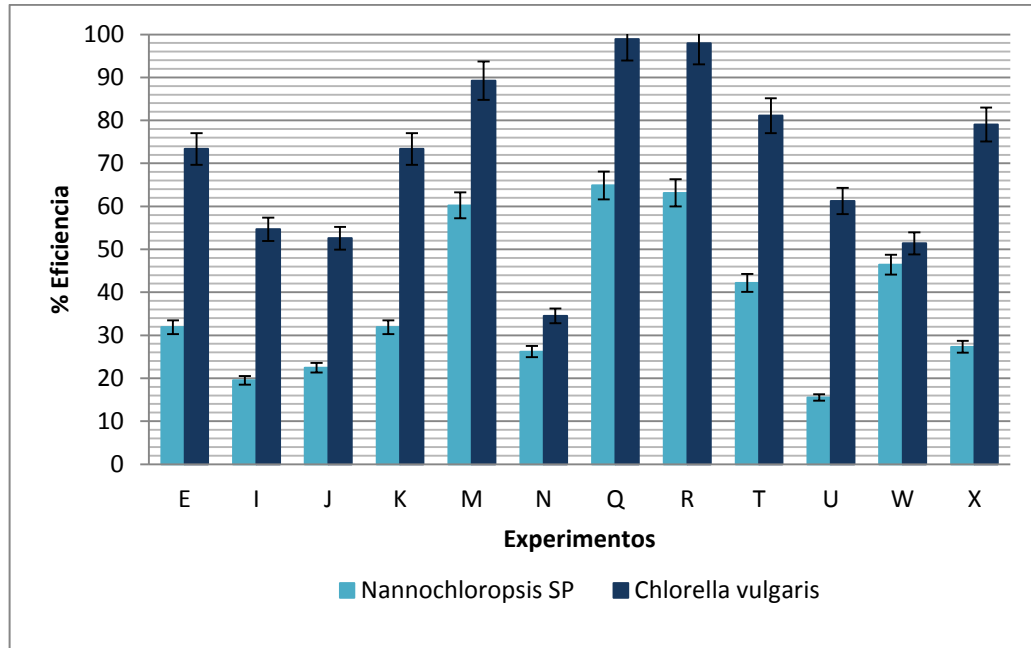
Figura 3. Eficiencia de Extracción de lípidos de *Chlorella Vulgaris*



Como se muestra en la figura 3, gran parte de las pruebas alcanzó una mayor eficiencia de extracción de lípidos utilizando biomasa húmeda. En estudios anteriores donde se utilizó dimetil éter como solvente se obtuvo hasta un 97% de eficiencia a partir de biomasa húmeda, en comparación con la extracción Bligh and Dyer empleando biomasa seca [33]. El experimento Q, donde se utilizó una relación biomasa solvente de 5g/L y solución extractora de metanol:cloroformo:agua (0.5:4:0.2) alcanzó la mayor eficiencia de extracción correspondiente al 98.9%.

Una vez obtenidos los resultados de las eficiencias de extracción de lípidos a partir de *Chlorella vulgaris*, se seleccionaron las pruebas con mayor eficiencia para realizarlas utilizando *Nannochloropsis Sp* húmeda. Se compararon las eficiencias de extracción de lípidos de estas dos microalgas. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4.

Figura 4. Comparación de eficiencias de extracción de lípidos entre *Chlorella Vulgaris* y *Nannochloropsis Sp* utilizando biomasa húmeda

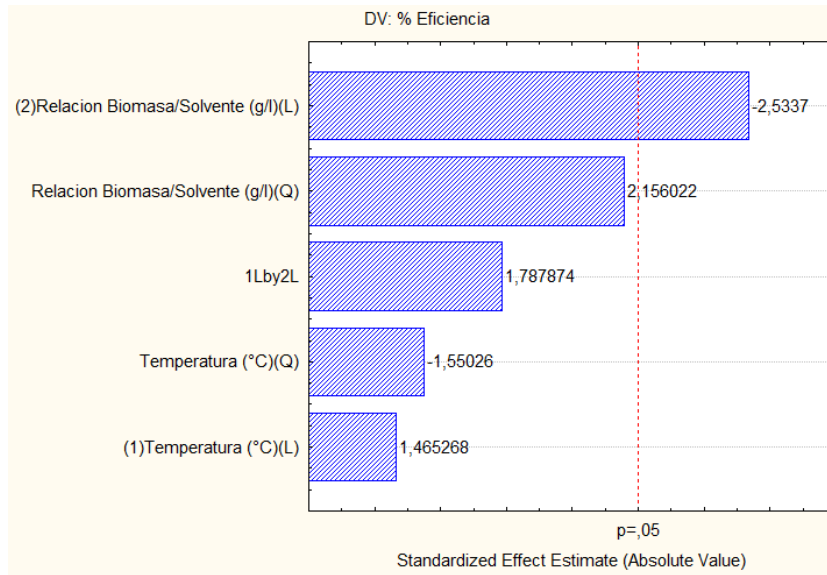


En la figura 4 se observa un comportamiento similar al presentado utilizando la metodología basada en Sathish *et al.* El experimento Q alcanzó el mayor porcentaje de eficiencia (98.89%) se llevó a cabo con una relación biomasa solvente de 5g/L y solución extractora de metanol:cloroformo:agua (0.5:4:0.2) .

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.3.1 Metodología según lo propuesto por Sathish et al. Mediante el diseño de experimentos descrito en la tabla 2 se evaluó la influencia de las variables relación biomasa/solvente, temperatura de solvente y volumen de solvente, sobre la eficiencia de extracción de lípidos. A partir de los resultados obtenidos y utilizando el programa STATISTIC 7.0, se generó el diagrama de Pareto de la figura 6.

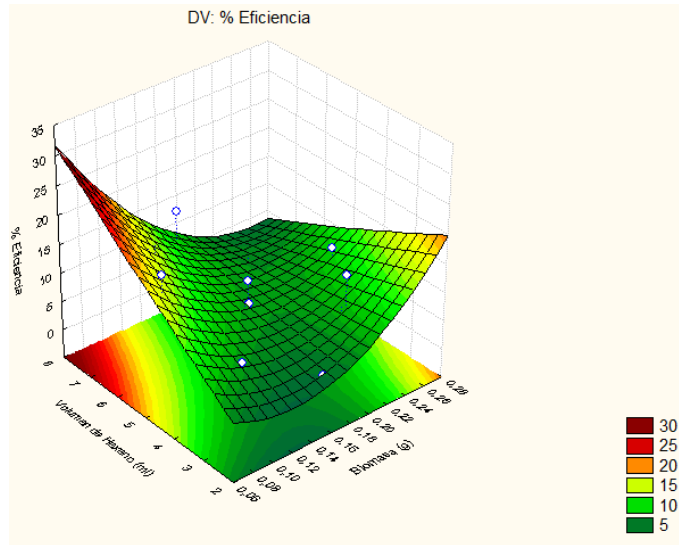
Figura 6. Diagrama de Pareto utilizando *Chlorella vulgaris* húmeda



La relación biomasa/solvente es la variable más significativa en la eficiencia de extracción de lípidos en biomasa húmeda, esto debido a que sobrepasa el umbral de significancia de 0.05 (línea punteada). El resultado del diagrama de Pareto, permite inferir que a menor relación biomasa/solvente se obtienen mejores eficiencias de extracción. Lo que significa que aumentando el volumen de hexano es posible extraer mayor cantidad de lípidos. Por otra parte, la temperatura no muestra influencia significativa en la eficiencia de extracción, para la metodología utilizada. Sin embargo, algunos autores aseguran que a temperaturas superiores al punto de ebullición de los solventes se logran mejores resultados en la extracción de lípidos. [17,32]

Teniendo en cuenta lo anterior se generó la superficie de respuesta para la eficiencia de extracción lípidos evaluando las variables biomasa y volumen de solvente. El resultado obtenido se presenta en la figura 7.

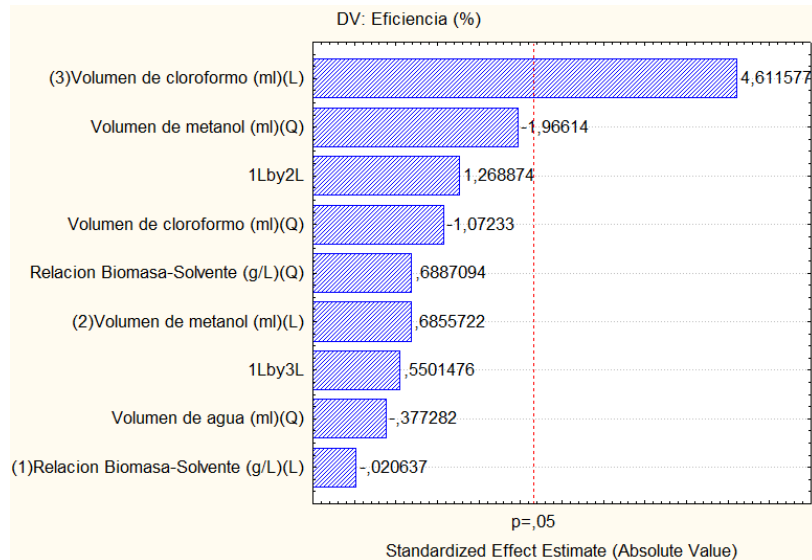
Figura 7. Superficie de respuesta de extracción de lípidos utilizando *Chlorella vulgaris* húmeda



En la figura 7 se puede observar que el comportamiento de la eficiencia es acorde a los resultados obtenidos en el diagrama de Pareto, donde una menor relación biomasa/solvente incrementa sustancialmente el valor de la eficiencia.

2.3.2 Metodología según lo propuesto por Bligh and Dyer. Mediante el diseño de experimentos descrito en la Tabla 3 se evaluó la influencia de las variables relación biomasa/solvente y volumen de los componentes de la solución extractora, sobre la eficiencia de extracción de lípidos. A partir de los resultados obtenidos y utilizando el programa STATISTIC 7.0, se generó el diagrama de Pareto de la figura 8

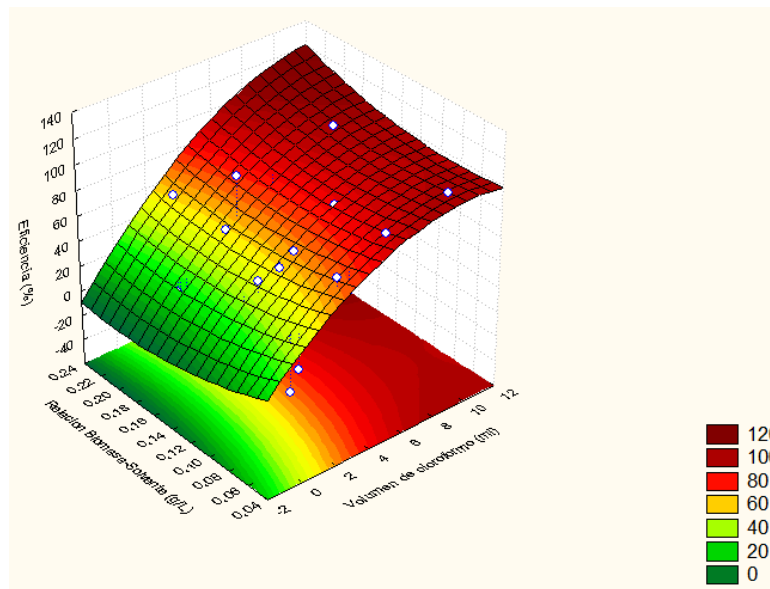
Figura 8. Diagrama de Pareto utilizando *Chlorella vulgaris* húmeda



El volumen de cloroformo fue la variable significativa en esta metodología de extracción, debido a que sobrepasa el umbral de significancia de 0.05 (línea punteada). El resultado del diagrama de Pareto, permite asegurar que a mayor volumen de cloroformo se obtienen mejores resultados en la eficiencia de extracción. Yao *et al* [23] encontró, que al aumentar el volumen de solvente, la cantidad de lípidos obtenidos también aumenta. Por otra parte Rezende dos Santos *et al* [34] presentó un estudio en el que se variaban las proporciones de cloroformo:metanol y como resultado se obtenían mayores extractos lipídicos al aumentar la proporción de cloroformo. Sin embargo, al incrementar el volumen del solvente, también se elevarían los costos de separación, purificación y recuperación del solvente.

Teniendo en cuenta lo anterior se generó la superficie de respuesta para la eficiencia de extracción lípidos, evaluando las variables volumen de cloroformo y relación biomasa/solvente. El resultado obtenido se presenta en la figura 9.

Figura 9. Superficie de respuesta de extracción de lípidos utilizando *Chlorella vulgaris* húmeda

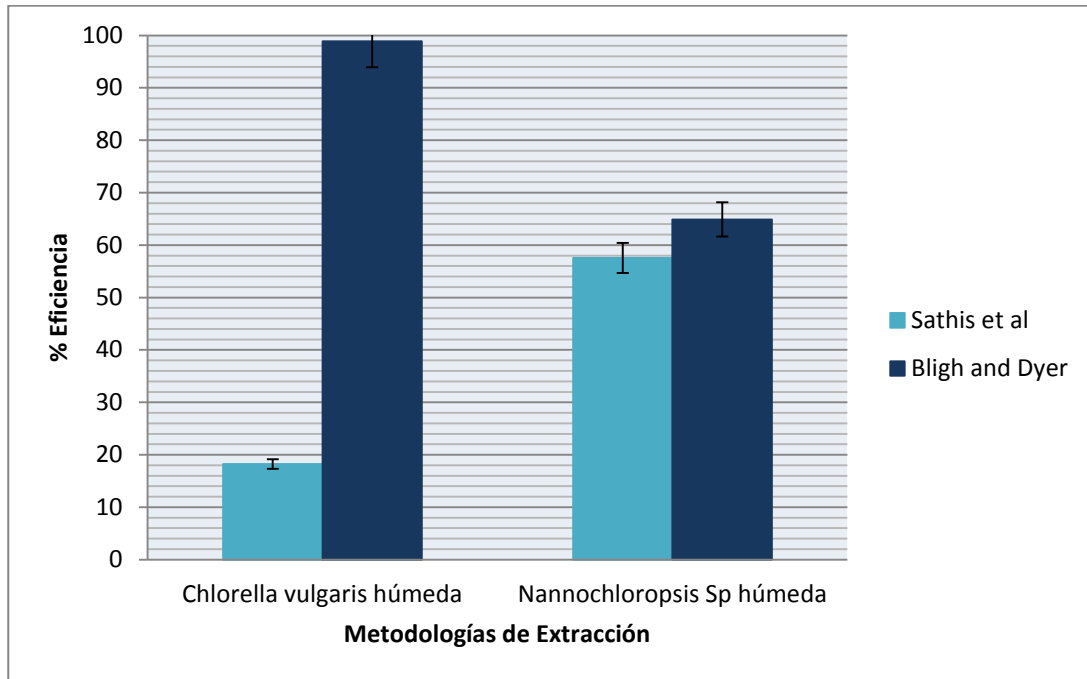


En la figura 9 se puede observar que el comportamiento de la eficiencia es acorde a los resultados obtenidos en el diagrama de Pareto, donde un mayor volumen de cloroformo incrementa el valor de la eficiencia.

2.4. ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LAS METODOLOGÍAS EVALUADAS (SATHISH *ET AL* Y BLIGH AND DYER).

En la figura 10 se presentan los resultados obtenidos de la mejor prueba para cada una de las metodologías evaluadas.

Figura 10. Comparación de métodos de extracción evaluados.



La prueba Q (método Bligh and Dyer) con relación biomasa solvente de 5 g/L y solución extractora metanol:cloroformo:agua de relación (0.5:4:0.2) alcanzó el valor de eficiencia más alto, comparado con la prueba A (Sathish *et al*) a condiciones de temperatura de 42.5 °C y relación biomasa solvente de 15.73 g/L. Esto demuestra que es posible extraer hasta 5.5 veces más lípidos con la metodología Bligh and Dyer utilizando biomasa húmeda de *Chlorella vulgaris*.

Por otra parte, al comparar las dos metodologías empleando *Nannochloropsis Sp* húmeda se observa que hay una diferencia poco significativa entre las eficiencias de extracción. Los porcentajes obtenidos fueron de 64.9% y 57.53% utilizando Bligh and Dyer y Sathish *et al* respectivamente.

En la metodología propuesta por Bligh and Dyer es posible extraer una gran cantidad de componentes lipídicos [35], no obstante, la poca selectividad del

cloroformo, permite extraer otros metabolitos no deseados. Jeon *et al* (2013) [36], y Rezende dos Santos [34] plantean la posibilidad de sobreestimar el valor de la eficiencia en la extracción de lípidos debido a la presencia de impurezas como, clorofilas, carotenoides, hidrocarburos, aldehídos, fosfolípidos y glicolípidos. Lo anterior, podría incrementar el costo del proceso, dada la necesidad de purificar el extracto obtenido.

Por otra parte el hexano es selectivo hacia los lípidos neutros saponificables y pequeñas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados [37]. Esto, podría explicar la baja eficiencia del método evaluado (Sathis *et al*). Sin embargo, esta metodología se puede optimizar aumentando la temperatura del solvente, como lo plantea Shin *et al* [32] en su estudio de extracción con hexano en condiciones cercanas al punto crítico.

En los anexos 1 y 2 se presentan los resultados de las eficiencias de extracción de lípidos obtenidas a partir de las metodologías empleadas utilizando biomasa húmeda

2.5. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO LIPÍDICO

Los extractos lipídicos de las mejores pruebas de extracción de los métodos evaluados, se caracterizaron por cromatografía de gases. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 5 y 6 para *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis Sp* respectivamente. Adicionalmente, estos resultados fueron comparados con caracterizaciones reportadas en la literatura.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos de *Chlorella Vulgaris*.

Ácidos grasos	Nomenclatura	(%) Teórico*	(%)	(%)
			Ashik Sathish	Bligh and Dyer
Palmítico	16:00	19,2	25,5	12,9
Esteárico	18:00	14,6	32,9	7,9
Oleico	18:01	12,66	1,8	19,2
Linolénico	18:03	21,09	2,5	17,8

Fuente: [27, 38, 39]*

Los valores experimentales para la extracción de ácidos palmítico y esteárico empleando el método propuesto por Sathish *et al* son superiores a los reportados en la literatura. Por otra parte se obtienen valores poco significativos para el ácido oleico y linoleico, demostrando su selectividad hacia cierto tipo de ácidos grasos como se muestra en la tabla 5. [37]

El método Bligh and Dyer presenta porcentajes de ácidos grasos cercanos a los reportados en la tabla 5, debido a la poca selectividad del método. [36]

Tabla 6. Composición de ácidos grasos de *Nannochloropsis Sp.*

Ácidos grasos	Nomenclatura	(%)	(%)	(%)
		Teórico*	Ashik Sathish	Bligh and Dyer
Palmítico	16:00	6,91	19,7	1,9
Heptadecanoico	17:00	0,11	41,2	3,8
Esteárico	18:00	0,14	25	3,1
Eicosapentanoico	20:05	10,43	1,4	8,6

Fuente: [29]*

En *Nannochloropsis Sp* se evidencia un comportamiento similar al presentado por *chlorella vulgaris*, demostrando selectividad empleando el método Sathis *et al* y valores cercanos para Bligh and Dyer (Tabla 6).

Los resultados de la cromatografía de gases para *Chlorella Vulgaris* se presentan en los anexos 3-4 y para *Nannochloropsis Sp* en los anexos 5-6, obtenidos a partir de las metodologías ya mencionadas.

3. CONCLUSIONES

Las mejores condiciones de extracción utilizando la metodología propuesta por Sathis *et al* fueron: relación biomasa/solvente de 15.73 g/L y temperatura de solvente de 42.5 °C, logrando una eficiencia de extracción de 18.22% empleando *Chlorella vulgaris* húmeda. Por otra parte para *Nannochloropsis Sp* húmeda, las mejores condiciones de extracción fueron: relación biomasa/solvente de 16.92 g/L y temperatura de solvente de 60 °C, logrando una eficiencia de extracción de 16.93%.

El análisis del diseño experimental para el método Sathish *et al* mostró que la variable relación biomasa/solvente influye significativamente en los porcentajes de eficiencia de extracción. Los valores de la eficiencia aumentan cuando la extracción se lleva a cabo con una menor relación biomasa/solvente.

Los porcentajes de extracción de ácidos grasos empleando el método propuesto por Sathish *et al* muestran valores superiores a los registrados en la literatura, lo cual hace del método una opción atractiva para obtener ácido palmítico, esteárico y heptadecanoico utilizando biomasa húmeda.

Las mejores condiciones de extracción utilizando la metodología propuesta por Bligh and Dyer fueron: relación biomasa/solvente de 5 g/L y y solución extractora de metanol:cloroformo:agua de relación 0.5:4:0.2 alcanzando una eficiencia de extracción de lípidos de 98.9% empleando *Chlorella vulgaris* húmeda. Por otra parte las mejores condiciones de operación utilizando *Nannochloropsis Sp* húmeda fueron: relación biomasa/solvente de 5 g/L y y solución extractora de metanol:cloroformo:agua de relación 0.5:4:0.2, alcanzando una eficiencia de extracción de lípidos de 64,9%.

El análisis del diseño experimental para el método Bligh and Dyer mostró que la variable volumen de cloroformo influye significativamente en los porcentajes de eficiencia de extracción. Los valores de la eficiencia aumentan al aumentar el volumen de cloroformo.

Bligh and Dyer presentó lo mejores resultados de eficiencias de extracción de lípidos a partir de biomasa húmeda. El método propuesto por Sathish *et al* muestra ser una gran alternativa al momento de obtener los ácidos grasos más comunes.

4. RECOMENDACIONES

Evaluar otros métodos de disrupción celular como ultrasonido o microondas, en combinación con las metodologías planteadas que puedan incrementar el porcentaje de extracción de lípidos y su eficiencia.

Aplicar y validar la metodología propuesta en este trabajo a otras especies de microalgas.

Buscar métodos alternativos para identificar los componentes no lipídicos que generan ruido en los cromatogramas como pueden ser las fracciones de biomasa solubles en cloroformo y hexano.

Evaluar la metodología propuesta por Sathish *et al* a temperaturas cercanas a la temperatura crítica del hexano.

Evaluar las metodologías propuestas con solventes menos tóxicos y más amigables con el medio ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Holum, John R. Fundamentos de Química General y Bioquímica para Ciencias de la Salud. Editorial Limusa – Wiley. México, 2001.
- [2]. Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends Biotechnol 126–31. 2008
- [3]. Murray Robert K. BIOQUIMICA HARPER. Bioquímica Ilustrada 28^a . ED EDITORIAL: MCGRAW-HILL. 2010
- [4]. E. Molina Grima, E.-H. Belarbi, F.G. Ación Fernández, A.Robles Medina, Yusuf Chisti. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. 2002.
- [5]. Karen M. MacDougall, Jesse McNichol, Patrick J. McGinn, Stephen J. B. O’Leary, Jeremy E. Melanson. Triacylglycerol profiling of microalgae strains for biofuel feedstock by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. 2011
- [6]. Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., F.-W. Bai, F.-W. & Chang, J.-S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*. 2013
- [7]. Borowitzka M.A. Fats, oils and hydrocarbons. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ, editors. Micro-algal biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press. 1988
- [8]. Benemann JR, Oswald WJ. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass. Biotechnology and Bioengineering Department of Energy. Pittsburgh: Pittsburgh Energy Technology Center. 1996.

- [9]. P. SPOLAORE, C. JOANNIS-CASSAN, E. DURAN, A. ISAMBERT. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006.
- [10]. Mata T, Martins A, Caetano N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.2010.
- [11]. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*. 2007
- [12]. Jae-Yon Lee, Chan Yoo, So-Young Jun, Chi-Yong Ahn, Hee-Mock Oh. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. 2010
- [13]. EHIMEN, E.A. Energy Balance of Microalgal-derived Biodiesel. 2010
- [14]. GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel Production with Microalgae as Feedstock: from Strains to Biodiesel, 2011.
- [15]. Richmond A. Handbook of microalgal culture: *biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd. 2004
- [16]. Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, Karim AA, Abbas KA, Norulaini NAN, et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – a review. *J Food Eng* 2009.
- [17]. Ashik Sathish, Ronald C. Sims. Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. 2012
- [18]. Anderson, Jordan & Sorek, Benjamin. Microalgae: the fuel of tomorrow. *University of Pittsburg*. 2008

- [19]. LEE, Seog J., YOON, Beyung-Dae and OH, Hee-Mock. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. 1998.
- [20]. Jae-Yon Lee, Chan Yoo, So-Young Jun, Chi-Yong Ahn, Hee-Mock Oh. Comparison of several methods for effective lipid extraction form microalgae 2010.
- [21]. BLIGH, E. G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. Vol 37. 1959, p. 911-917
- [22]. González, A., Kafarov, V., & Monsalve, A. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. 2009
- [23]. Yao Linxing, Gerde Jose A., Wang Tom, Oil extraction from microalga *Nannochloropsis* with Isopropyl Alcohol. 2012
- [24]. Xu Lixian, Brillman Derk W.F., Withag Jan A.M., Brem Gerrit, Kersten Sascha, Assesment of a dry and wet route for the production of biofuels from microalgae: Energy balance analysis. 2010
- [25]. Lardon L. Hélias A, Slihalve B, Steyr J-P, Bemard O. Lyfe cycle assessment of biodiesel production from microalgae.2009
- [26]. Borowitzka, M.A. Moheimani N.R. Algae for Biofuels and Energy. EDITORIAL: SPRINGER. 2013,(P. 277)
- [27]. Jian-Ming Lv, L.-H.C., Xin-Hua Xu, Lin Zhang, Huan-Lin Chen, Enhanced Lipid Production Of *Chlorella Vulgaris* By Adjustment Of Cultivation Conditions. *Bioresource Technology*, 2010. (P. 6797–6804)

- [28]. Pruvost, J., Et Al., Systematic Investigation Of Biomass And Lipid Productivity By Microalgae In Photobioreactors For Biodiesel Application. Bioresource Technology. 2010 (P. 150-158)
- [29]. Nobre BP, Villalobos F, Barragán BE, Oliveira AC, Batista AP, Marques PA, Mendes RL, Sovová H, Palavra AF, Gouveia L. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga--extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass.2012
- [30]. Jones J., Manning S., Montoya M., Keller K., Poenie M., Extraction of Algal Lipids and Their Analysis by HPLC and Mass Spectrometry. 2012
- [31]. Serrano Bermúdez L. M. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel.
- [32]. Hee-Yong Shin , Jae-Hun Ryu , Seong-Youl Bae , Czarena Crofcheck , Mark Crocker. Lipid extraction from *Scenedesmus* sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. 2014
- [33]. Hideki Kanda, Peng Li , Tsuyoshi Ikehara , Mina Yasumoto-Hirose . Lipids extracted from several species of natural blue–green microalgae by dimethyl ether: Extraction yield and properties. 2011
- [34]. Raquel Rezende dos Santos, Daniel Mendonça Moreira, Claudete Norie Kunigami,Donato Alexandre Gomes Aranda , Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. 2014
- [35]. Lee Yae Jon, Yoo Chang, Ju So Young, Ahn Chi yong, Oh Hee Mock.Comparison of several methods of effective lipid extraction from microalgae.2009

- [36]. Jong-min Jeon , Hee-Won Choi , Guen-Chan Yoo , Yong-Kuen Choi ,Kwon-Young Choi , Hyung-Yeon Park , Sung-Hee Park ,Yun-Gon Kim , Hyung Joo Kim , Sang Hyun Lee , Yoo Kyung Lee ,Yung-Hun Yang New mixture composition of organic solvents forefficient extraction of lipids from *Chlorella vulgaris*. 2013
- [37]. Jiménez Callejón M.J., Robles Medina A., Macías Sánchez M., Peña E.H., Cerdán L.E., González Moreno P.A., Molina Grima E. Extraction of saponifiable lipids from wet microalgal biomass for biodiesel production. (2014)
- [38]. Travieso, L., Et Al., Batch Mixed Culture Of *Chlorella Vulgaris* Using Settled And Diluted Piggery Waste. *Ecological Engineering*.2006. (P. 158-165)
- [39]. Li-Hai Fan, Y.-T.Z., Lin Zhang, Huan-Lin Chen, Evaluation Of A Membrane-Sparged Helical Tubular Photobioreactor For Carbon Dioxide Biofixation By *Chlorella Vulgaris*. *Journal Of Membrane Science*.2008(P. 336-345)

BIBLIOGRAFÍA

Anderson, Jordan & Sorek, Benjamin. Microalgae: the fuel of tomorrow. *University of Pittsburg*. 2008

Ashik Sathish, Ronald C. Sims. Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. 2012

Benemann JR, Oswald WJ. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass. Biotechnology and Bioengineering Department of Energy. Pittsburgh: Pittsburgh Energy Technology Center. 1996.

BLIGH, E. G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. En: Journal Biochemical Physiology*. Vol 37. 1959, p. 911-917

Borowitzka M.A. Fats, oils and hydrocarbons. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ, editors. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press. 1988

Borowitzka, M.A. Moheimani N.R. Algae for Biofuels and Energy. EDITORIAL: SPRINGER. 2013,(P. 277)

Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., F.-W. Bai, F.-W. & Chang, J.-S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*. 2013

Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol* 126–31. 2008

Chisti, Y. Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*. 2007

E. Molina Grima, E.-H. Belarbi, F.G. Acién Fernández, A.Robles Medina, Yusuf Chisti. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. 2002.

EHIMEN, E.A. Energy Balance of Microalgal-derived Biodiesel. 2010

GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel Production with Microalgae as Feedstock: from Strains to Biodiesel, 2011.

González, A., Kafarov, V., & Monsalve, A. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. 2009

Hee-Yong Shin , Jae-Hun Ryu , Seong-Youl Bae , Czarena Crofcheck , Mark Crocker. Lipid extraction from Scenedesmus sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. 2014

Hideki Kanda, Peng Li , Tsuyoshi Ikehara , Mina Yasumoto-Hirose . Lipids extracted from several species of natural blue–green microalgae by dimethyl ether: Extraction yield and properties. 2011

Holum, John R. Fundamentos de Química General y Bioquímica para Ciencias de la Salud. Editorial Limusa – Wiley. México, 2001.

Jae-Yon Lee, Chan Yoo, So-Young Jun, Chi-Yong Ahn, Hee-Mock Oh. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. 2010

Jae-Yon Lee, Chan Yoo, So-Young Jun, Chi-Yong Ahn, Hee-Mock Oh. Comparison of several methods for effective lipid extraction form microalgae 2010.

Jian-Ming Lv, L.-H.C., Xin-Hua Xu, Lin Zhang, Huan-Lin Chen, Enhanced Lipid Production Of *Chlorella Vulgaris* By Adjustment Of Cultivation Conditions. *Bioresource Technology*, 2010. (P. 6797–6804)

Jiménez Callejón M.J., Robles Medina A., Macías Sánchez M., Peña E.H., Cerdán L.E., González Moreno P.A., Molina Grima E. Extraction of saponifiable lipids from wet microalgal biomass for biodiesel production. (2014)

Jones J., Manning S., Montoya M., Keller K., Poenie M., Extraction of Algal Lipids and Their Analysis by HPLC and Mass Spectrometry. 2012

Jong-min Jeon , Hee-Won Choi , Guen-Chan Yoo , Yong-Kuen Choi ,Kwon-Young Choi , Hyung-Yeon Park , Sung-Hee Park ,Yun-Gon Kim , Hyung Joo Kim , Sang Hyun Lee , Yoo Kyung Lee ,Yung-Hun Yang New mixture composition of organic solvents forefficient extraction of lipids from *Chlorella vulgaris*. 2013

Karen M. MacDougall, Jesse McNichol, Patrick J. McGinn, Stephen J. B. O’Leary, Jeremy E. Melanson. Triacylglycerol profiling of microalgae strains for biofuel feedstock by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. 2011

Lardon L. Hélias A, Sliavle B, Steyr J-P, Bemard O. Lyfe cycle assessment of biodiesel production from microalgae.2009

Lee Yae Jon, Yoo Chang, Ju So Young, Ahn Chi yong, Oh Hee Mock.Comparison of several methods of effective lipid extraction from microalgae.2009

LEE, Seog J., YOON, Beyung-Dae and OH, Hee-Mock. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. 1998.

Li-Hai Fan, Y.-T.Z., Lin Zhang, Huan-Lin Chen, Evaluation Of A Membrane-Sparged Helical Tubular Photobioreactor For Carbon Dioxide Biofixation By *Chlorella Vulgaris*. *Journal Of Membrane Science*.2008(P. 336-345)

Mata T, Martins A, Caetano N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.2010.

Murray Robert K. BIOQUIMICA HARPER. *Bioquimica Ilustrada 28^a* . ED EDITORIAL: MCGRAW-HILL. 2010

Nobre BP, Villalobos F, Barragán BE, Oliveira AC, Batista AP, Marques PA, Mendes RL, Sovová H, Palavra AF, Gouveia L. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga--extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass.2012

P. SPOLAORE, C. JOANNIS-CASSAN, E. DURAN, A. ISAMBERT. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006.

Pruvost, J., Et Al., Systematic Investigation Of Biomass And Lipid Productivity By Microalgae In Photobioreactors For Biodiesel Application. *Bioresource Technology*. 2010 (P. 150-158)

Raquel Rezende dos Santos, Daniel Mendonça Moreira, Claudete Norie Kunigami, Donato Alexandre Gomes Aranda , Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. 2014

Richmond A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd. 2004

Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, Karim AA, Abbas KA, Norulaini NAN, et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – a review. J Food Eng 2009.

Serrano Bermúdez L. M. Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel.

Travieso, L., Et Al., Batch Mixed Culture Of Chlorella Vulgaris Using Settled And Diluted Piggery Waste. Ecological Engineering. 2006. (P. 158-165)

Xu Lixian, Brillman Derk W.F., Withag Jan A.M., Brem Gerrit, Kersten Sascha, Assesment of a dry and wet route for the production of biofuels from microalgae: Energy balance analysis. 2010

Yao Linxing, Gerde Jose A., Wang Tom, Oil extraction from microalga Nannochloropsis with Isopropyl Alcohol. 2012

ANEXOS

**ANEXO A. RESULTADOS DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS
UTILIZANDO EL MÉTODO EMPLEADO POR SATHIS *ET AL* CON BIOMASA
HÚMEDA.**

Prueba	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis Sp</i>
	% Eficiencia	% Eficiencia
A	18,22	19,56
B	10,59	7,25
C	6,39	-
D	10,59	9,24
E	9,62	4,67
F	13,69	11,46
G	3,92	-
H	2,94	-
I	4,20	-
J	11,90	57,53
K	12,85	7,10
L	2,33	-
M	3,57	-
N	12,04	9,18
O	6,27	-
P	6,58	39,52
Q	3,48	-

**ANEXO B. RESULTADOS DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS
UTILIZANDO EL MÉTODO EMPLEADO POR BLIGH AND DYER CON
BIOMASA HÚMEDA.**

Prueba	<i>Chlorella vulgaris</i> % Eficiencia	<i>Nannochloropsis Sp</i> % Eficiencia
C	26,71	-
D	19,46	-
E	73,36	31,88
F	55,04	-
G	16,86	-
H	6,59	-
I	54,67	19,51
J	52,58	22,48
K	73,36	31,88
L	55,04	-
M	89,25	60,22
N	34,51	26,20
O	58,01	-
P	91,91	-
Q	98,89	64,88
R	97,96	63,13
T	81,12	42,19
U	61,23	15,52
V	50,41	-
W	51,39	46,42
X	79,05	27,30

**ANEXO C. RESULTADOS DE PRUEBAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES
PARA METODOLOGÍA DESCRITA POR ASHIK SATHISH ET AL EMPLEANDO
BIOMASA HÚMEDA DE CHLORELLA VULGARIS**

	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	INFORME DE ENSAYO	FOITIE.01
			Versión: 02
			Página 1 de 2

INFORME DE ENSAYO

Número: 497-14

FECHA: Agosto 22 de 2014
 NOMBRE/EMPRESA: Paola Sanguino -UIS
 DIRECCIÓN: Cra 27 Calle 9
 TELÉFONO: 300571 2222
 CÓDIGO DE LA MUESTRA: M534-14
 PRODUCTO: Chorella B1H

FECHA DE RECEPCIÓN: Agosto 13 de 2014
 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: Agosto 14 a Agosto 15 de 2014

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS:

1. El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo mediante la obtención de sus metilésteres y cuantificación por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID), según las normas NTC 4967 y NTC 5013 ("*Grasas y aceites animales y vegetales, Preparación y análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por Cromatografía de gases*"). El análisis cromatográfico de la muestra se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) AT 7890N (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU.), con detector de ionización de llama (FID). La columna empleada en el análisis fue HP88 (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) [88%-cianopropil-aril-polisiloxano), 60 m x 0,25 mm x 0,20 µm]. La inyección se realizó en modo *Split* (10:1) (V_{inj} : 2µL).

TABLA 1. RESULTADOS ANÁLISIS M534-14

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES				
NOMBRE	NC*	CANTIDAD RELATIVA 1 (%)	CANTIDAD RELATIVA 2 (%)	PROMEDIO
Palmitico	(C16:0)	25,5	25,5	25,5
Heptadecanoico	(C17:0)	30,7	30,7	30,7
cis-10-heptadecenoico	(C17:1)	2,0	2,0	2,0
Esteárico	(C18:0)	32,9	32,9	32,9
Oleico	(C18:1n9c)	1,8	1,8	1,8
g-Linolénico	(C18:3n6)	2,5	2,5	2,5
Araquídico	(C20:0)	4,6	4,6	4,6

REVISÓ Y AUTORIZÓ

Arley R. Villamizar J.
 Químico PQ 2839
 Coordinador de Calidad

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, NO PUEDE SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDO SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO

FIN DEL INFORME

**ANEXO D. RESULTADOS DE PRUEBAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES
PARA METODOLOGÍA DESCRITA POR Blich and Dyer *ET AL*
EMPLEANDO BIOMASA HÚMEDA DE *CHLORELLA VULGARIS***

 	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	INFORME DE ENSAYO	FOITIE.01
			Versión: 02
			Página 1 de 2

INFORME DE ENSAYO

Número: 507-14

FECHA: Agosto 29 de 2014
NOMBRE/EMPRESA: Paola Sanguino -UIS
DIRECCIÓN: Cra 27 Calle 9
TELÉFONO: 300571 2222
CÓDIGO DE LA MUESTRA: M544-14
PRODUCTO: Chlorella JH11

FECHA DE RECEPCIÓN: Agosto 13 de 2014
REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: Agosto 14 a Agosto 25 de 2014

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS:

1. El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo mediante la obtención de sus metilésteres y cuantificación por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID), según las normas NTC 4967 y NTC 5013 (*"Grasas y aceites animales y vegetales, Preparación y análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por Cromatografía de gases"*). El análisis cromatográfico de la muestra se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) AT 7890N (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU.), con detector de ionización de llama (FID). La columna empleada en el análisis fue HP88 (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) [88%-cianopropil-aril-polisiloxano), 60 m x 0,25 mm x 0,20 µm]. La inyección se realizó en modo *Split* (10:1) (V_{iny} : 2µL).

TABLA 1. RESULTADOS ANÁLISIS M544-14

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES				
NOMBRE	NC*	CANTIDAD RELATIVA 1 (%)	CANTIDAD RELATIVA 2 (%)	PROMEDIO
Palmitico	(C16:0)	12,9	12,9	12,9
Palmitoleico	(C16:1)	3,7	3,7	3,7
Heptadecanoico	(C17:0)	2,6	2,6	2,6
cis-10-heptadecenoico	(C17:1)	1,6	1,6	1,6
Estearico	(C18:0)	7,9	7,9	7,9
Oleico	(C18:1n9c)	19,2	19,2	19,2
Linoléico	(C18:2n6c)	14,9	14,9	14,9
g-Linolénico	(C18:3n6)	0,9	0,9	0,9
Araquídico	(C20:0)	8,8	8,8	8,8
Linolénico	(C18:3n3)	17,8	17,8	17,8
Eicosapentanoico	(C20:5n3)	1,0	1,0	1,0
Lignocérico	(C24:0)	0,8	0,8	0,8

REVISÓ Y AUTORIZÓ

Arley R. Villamizar J.
 Químico PQ 2839
 Coordinador de Calidad

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, NO PUEDE SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDO SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO

FIN DEL INFORME

**ANEXO E. RESULTADOS DE PRUEBAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES
PARA METODOLOGÍA DESCRITA POR ASHIK SATHISH *ET AL* UTILIZANDO
BIOMASA HÚMEDA DE *NANNOCHLOROPSIS SP***

	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	INFORME DE ENSAYO	FOITIE.01
			Versión: 02
			Página 1 de 2

INFORME DE ENSAYO

Número: 503-14

FECHA: Agosto 29 de 2014
NOMBRE/EMPRESA: Paola Sanguino -UIS
DIRECCIÓN: Cra 27 Calle 9
TELÉFONO: 300571 2222
CÓDIGO DE LA MUESTRA: M540-14
PRODUCTO: Nanocloropsis KN

FECHA DE RECEPCIÓN: Agosto 13 de 2014
REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: Agosto 14 a Agosto 25 de 2014

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS:

1. El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo mediante la obtención de sus metilésteres y cuantificación por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID), según las normas NTC 4967 y NTC 5013 ("*Grasas y aceites animales y vegetales, Preparación y análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por Cromatografía de gases*"). El análisis cromatográfico de la muestra se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) AT 7890N (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU.), con detector de ionización de llama (FID). La columna empleada en el análisis fue HP88 (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) [88%-cianopropil-aril-polisiloxano), 60 m x 0,25 mm x 0,20 µm]. La inyección se realizó en modo *Split* (10:1) (V_{iny} : 2µL).

TABLA 1. RESULTADOS ANÁLISIS M540-14

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES				
NOMBRE	NC*	CANTIDAD RELATIVA 1 (%)	CANTIDAD RELATIVA 2 (%)	PROMEDIO
Palmítico	(C16:0)	19,7	19,7	19,7
Heptadecanoico	(C17:0)	41,2	41,2	41,2
Esteárico	(C18:0)	25,0	25,0	25,0
Oleico	(C18:1n9c)	1,6	1,6	1,6
g-Linolénico	(C18:3n6)	4,0	4,0	4,0
Heneicosanoico	(C21:0)	1,9	1,9	1,9
Eicosadienoico	(C20:2)	1,7	1,7	1,7
Araquidónico	(C20:4)	1,5	1,5	1,5
Docosadienoico	(C22:2n6)	2,0	2,0	2,0
Eicosapentanoico	(C20:5n3)	1,4	1,4	1,4


REVISÓ Y AUTORIZÓ

Arley R. Villamizar J.
 Químico PQ 2839
 Coordinador de Calidad

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, NO PUEDE SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDO SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO

FIN DEL INFORME

**ANEXO F. RESULTADOS DE PRUEBAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES
PARA METODOLOGÍA DESCRITA POR Blich and Dyer *ET AL*
EMPLEANDO BIOMASA HÚMEDA DE *NANNOCHLOROPSIS SP***

	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	INFORME DE ENSAYO	FOITIE.01
			Versión: 02
			Página 1 de 2

INFORME DE ENSAYO

Número: 321-14

FECHA: Junio 5 de 2014
 NOMBRE/EMPRESA: Paola Sanguino -UIS
 DIRECCIÓN: Cra 27 Calle 9
 TELÉFONO: 300571 2222

CÓDIGO DE LA MUESTRA: M324-14
 PRODUCTO: 6 Nannochloropsis inferior

FECHA DE RECEPCIÓN: Mayo 22 de 2014
 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: Mayo 28 de 2014

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS:

1. El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo mediante la obtención de sus metilésteres y cuantificación por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID), según las normas NTC 4967 y NTC 5013 (*"Grasas y aceites animales y vegetales, Preparación y análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por Cromatografía de gases"*). El análisis cromatográfico de la muestra se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) AT 7890N (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU.), con detector de ionización de llama (FID). La columna empleada en el análisis fue HP88 (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) [88%-cianopropil-aril-polisiloxano), 60 m x 0,25 mm x 0,20 µm]. La inyección se realizó en modo *Split* (10:1) (V_{iny} : 2µL).

TABLA 1. RESULTADOS ANÁLISIS M324-14

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES				
NOMBRE	NC*	CANTIDAD RELATIVA 1 (%)	CANTIDAD RELATIVA 2 (%)	PROMEDIO
Láurico	(C12:0)	1,3	1,3	1,3
Palmitico	(C16:0)	1,9	1,9	1,9
Palmitoleico	(C16:1)	2,3	2,3	2,3
Heptadecanoico	(C17:0)	3,8	3,8	3,8
Esteárico	(C18:0)	3,1	3,1	3,1
Linolénico	(C18:3n3)	53,2	53,2	53,2
Eicosenoico	(C20:1)	1,3	1,3	1,3
Eicosapentanoico	(C20:5n3)	8,6	8,6	8,6

REVISÓ Y AUTORIZÓ

Arley R. Villamizar J.
Químico PQ 2839
 Coordinador de Calidad

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, NO PUEDE SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDO SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO

ANEXO G. FOTOGRAFÍAS DEL PROCESO PARA EL DESARROLLO DE LAS METODOLOGÍAS PROPUESTAS.

Figura 11. Cultivo de microalgas.



Figura 12. Centrifugación y pesado de la biomasa recuperada.



Figura 13. Calentamiento de las muestras empleando el método Sathis *et al*



Figura 13. Homogenización de las muestras empleando los dos métodos

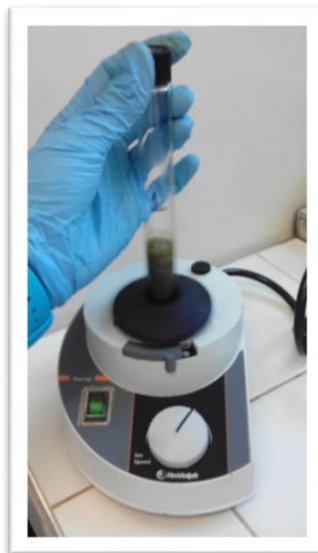


Figura 14. Obtención final de los extractos lipídicos empleando el método Sathis et al

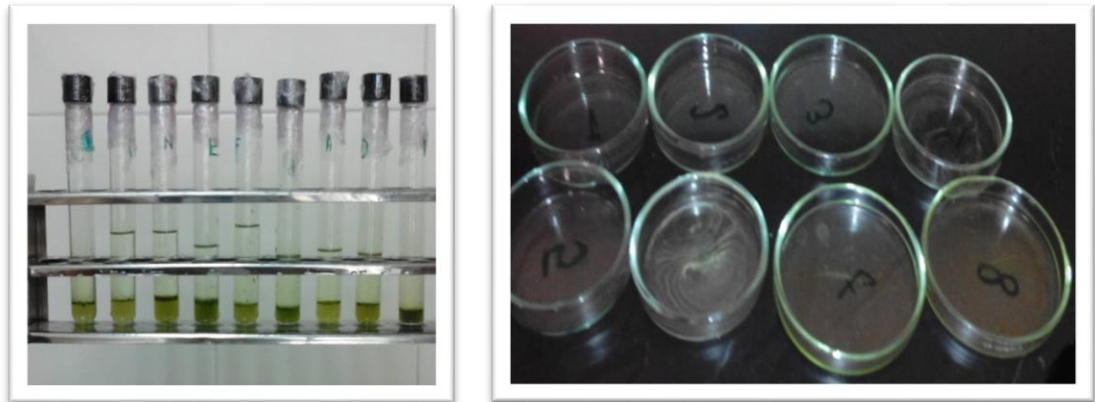


Figura 15. Obtención final de los extractos lipídicos empleando el método Bligh and Dyer

