

**ESTUDIO DEL PRETRATAMIENTO METANOL-ÁCIDO DE LA MICROALGA
Chaetoceros gracilis PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES
REDUCTORES TOTALES**

**ANDREA PAOLA MEZA SANTOS
ASTRID JULIANA SEPÚLVEDA SOTO**

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

2010

**ESTUDIO DEL PRETRATAMIENTO METANOL-ÁCIDO DE LA MICROALGA
Chaetoceros gracilis PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES
REDUCTORES TOTALES**

**ANDREA PAOLA MEZA SANTOS
ASTRID JULIANA SEPÚLVEDA SOTO**

**Trabajo de grado en la modalidad de investigación, presentado para optar
al título de Ingeniero Químico**

Directores

**VIATCHESLAV KAFAROV
Ingeniero Químico Dr. Sc**

**ANDRES FERNANDO BARAJAS
Biólogo**

Codirectores

**LAURA LILIANA GARZÓN FUENTES
Ingeniera Química Msc.
Instituto Colombiano de Petróleo ICP**

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

2010

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Ministerio de Agricultura y desarrollo rural, al Instituto Colombiano de Petróleo y al Instituto de Morrosquillo por el respaldo y apoyo económico.

Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov por su constante respaldo y ayuda.

Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano y a la Ing. Laura Garzón por todos sus valiosos aportes e incondicional y constante apoyo.

Don Eduardo y Wilson del laboratorio de procesos por su desinteresada colaboración, paciencia y todos sus valiosos aportes.

Grupo de investigación CIDES y al laboratorio de biomasa, por permitirnos contar con todos los medios necesarios para el desarrollo de esta investigación.

Al grupo de pretratamiento, por su apoyo, colaboración, esfuerzo, dedicación, entrega y unión para lograr la realización de este proyecto.

Universidad Industrial de Santander, por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales.

Y en general a todos los que colaboraron de una u otra forma en la ejecución de este proyecto.

A Dios por guiar cada uno de mis pasos, por mantener encendida la esperanza que me mueve y permitirme alcanzar y celebrar este logro.

A mi padre por el sacrificio y por ser fortaleza y aliento en todo momento.

A mi madre por tan inagotable dedicación, esfuerzo, ternura y por ser digno ejemplo a seguir.

A mis hermanos por su constante apoyo, paciencia e incontables consejos.

A mi familia por la confianza, apoyo e interés que han puesto durante mi vida.

A Diana Ruiz, por la confianza, cariño, paciencia, oportunidad, y constante apoyo a lo largo de mi carrera.

A mis amigas de toda la vida, Zirley y Magaly por estar siempre a mi lado de manera constante e inagotable.

A Astrid, Laura, Adri, Julieth y Fabio por cada experiencia vivida y por compartir nuestros sueños y logros durante el camino.

ANDREA PAOLA

A DIOS,

a mi madre y mis hermanos,

porque gracias a ellos he alcanzado este logro,

a Javier, por su amor, comprensión e incondicional apoyo,

y a todos los que compartieron esta experiencia conmigo, Paola,

Adriana, Julieth, Laura y Fabio.

ASTRID JULIANA

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO.....	2
1.1 Microalgas.....	2
1.1.1. Clasificación de las Microalgas.....	2
1.1.2 Composición química.....	3
1.2 <i>Chaetoceros gracilis</i>	5
1.3 Pretratamiento.....	5
1.3.1 Organosolv Metanol-ácido	6
1.4 Hidrólisis	7
1.5 Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	8
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	9
2.1 Materiales	9
2.1.1 Reactivos	9
2.1.2 Materia prima.....	9
2.2. Equipos	10
2.3 Procedimiento experimental.....	10
2.3.1 Pretratamiento	11
2.3.1.1 Preparación del Licor.....	11
2.3.1.2 Autoclavado	11
2.3.1.3 Filtrado y Lavado	11
2.3.1.4 Secado.....	11
2.3.1.5 Medición de concentración de azúcares reductores totales ART ..	12
2.3.2 Hidrólisis ácida.....	12
2.3.2.1 Prehidrólisis	13

2.3.2.2 Hidrólisis	13
2.3.2.3 Filtrado, Lavado, Secado y Determinación de ART	13
2.3.3 Diseño Experimental del Pretratamiento:.....	13
2.3.4 Análisis de resultados a través de STATITICA 7.0	13
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	14
3.1 Cálculo de la humedad teórica de la biomasa	14
3.2 Resultados de la Hidrólisis de biomasa sin pretratar.	14
3.3 Efecto del floculante en la medición de ART por espectrofotometría.....	14
3.4 Diseños experimentales de los pretratamiento	14
3.4.1 Diseño factorial 2 ³ central compuesto No.1 del pretratamiento metanol-ácido.	14
3.4.1.1 Análisis de la interacción entre las variables del pretratamiento....	18
3.4.1.1.1 Interacción Metanol-Ácido	19
3.4.1.1.2 Interacción Metanol-Tiempo.....	19
3.4.1.1.3 Interacción Ácido-Tiempo	20
3.4.2 Diseño factorial 2 ³ central compuesto No.2 del pretratamiento.	21
3.4.2.1 Diseño factorial 2 ³ central compuesto.....	21
3.4.2.1 Análisis de la interacción entre las variables del pretratamiento....	24
3.4.2.1.1 Interacción Metanol-Ácido	24
3.4.2.1.2 Interacción Metanol-Tiempo.....	25
3.4.2.1.3 Interacción Ácido-Tiempo	26
3.4.3 Ensayos adicionales	28
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	35

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Composición química de diferentes especies de microalgas.	4
Tabla 2. Tipos de pretratamiento	6
Tabla 3. Lista de reactivos.	9
Tabla 4. Equipos utilizados durante la experimentación.	10
Tabla 5. Rango de valores del Diseño Compuesto Central.	15
Tabla 6. Matriz de diseño con los resultados de ART obtenidos durante el Pretratamiento y la hidrólisis.	15
Tabla 7. Rango de valores del diseño central compuesto.	22
Tabla 8. Matriz de diseño factorial 2^3 compuesto central con tres puntos centrales y variable de respuesta de cada etapa	22
Tabla 9. Matriz de Efectos	27
Tabla 10. Análisis de la varianza	28
Tabla 11. Condiciones y resultados %ART para ensayos adicionales.	29
Tabla F1. Análisis sobre las muestras de <i>Chaetoceros gracilis</i> (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de FeCl_3 , por El Instituto Colombiano de Petróleo (ICP).	48
Tabla F2. Análisis sobre las muestras de <i>Chaetoceros gracilis</i> (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de FeCl_3 , por La Universidad de Antioquia (UDEA)	48
Tabla F3. Análisis efectuados sobre las muestras de <i>Ch gracilis</i> (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de FeCl_3 , en el laboratorio	49
Tabla G1. efecto del floculante sobre la medición de ART	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reacción DNS	8
Figura 2.	Diagrama de bloques Etapa de Pretratamiento	11
Figura 3.	Diagrama de bloques, etapa de hidrólisis.	12
Figura 4.	Masa solubilizada en el Pretratamiento	17
Figura 5.	Masa solubilizada en la Hidrólisis	17
Figura 6.	Gráfico de Pareto. Efectos de las variables de diseño	18
Figura 7.	H ₂ SO ₄ vs Metanol. Tiempo 2h. (a) superficie de respuesta (b) curva de nivel.	19
Figura 8.	Tiempo vs Metanol. Concentración de H ₂ SO ₄ : 0,075M. (a) Superficie de respuesta (b) curva de nivel.	20
Figura 9.	Tiempo vs H ₂ SO ₄ . Concentración de Metanol 50%v/v. (a) superficie de respuesta. (b) curva de nivel.	21
Figura 10.	Comparación resultados de pretratamiento e hidrólisis	24
Figura 11.	Superficie de respuesta H ₂ SO ₄ vs Metanol. Tiempo 131min.	24
Figura 12.	Superficie de respuesta Tiempo vs metanol. Concentración de H ₂ SO ₄ : 0.35M.	25
Figura 13.	Tiempo vs H ₂ SO ₄ . Concentración de Metanol 8.18%v/v.(a) Superficie de respuesta. (b) curva de nivel	26
Figura B1.	Curva de calibración DNS	37
Figura D1.	Superficie de respuesta H ₂ SO ₄ vs Metanol. (a) Tiempo 0.32h. (b) Tiempo 3.68h	40
Figura D2.	Superficie de respuesta tiempo vs metanol. (a) H ₂ SO ₄ 0.03 [M]. (b) H ₂ SO ₄ 0.12 [M].	41
Figura D3.	Superficie de respuesta tiempo vs H ₂ SO ₄ . (a) Concentración de metanol 16.36 [%v/v]. (b) Concentración de metanol 83.63 [%v/v].	43
Figura E1.	Superficie de respuesta H ₂ SO ₄ vs Metanol. (a) Tiempo 15.01 [min] (b) Tiempo 247 [min]	44
Figura E2.	Superficie de respuesta Tiempo vs metanol. (a)Concentración de H ₂ SO ₄ 0.1 [M]. (b)Concentración de H ₂ SO ₄ 0.6 [M].	45
Figura E3.	Superficie de respuesta tiempo vs H ₂ SO ₄ . Concentración de Metanol 8.18%v/v.	46

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
ANEXO A. Determinación de sólidos totales en biomasa Procedimiento analítico en el laboratorio (lap-nrel) nrel/tp- 510-42621	35
ANEXO B. Método del ácido dinitrosalicílico (dns)	36
ANEXO C. Cuantificación de azúcares después de la etapa de pretratamiento	39
ANEXO D. Análisis de la interacción entre las variables del diseño de experimentos No.1	40
ANEXO E. Análisis de la interacción entre las variables del diseño de experimentos No.2	44
ANEXO F. Caracterización de la biomasa	48
ANEXO G. efecto del floculante sobre la medición de azúcares reductores	50

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO DEL PRETRATAMIENTO METANOL-ÁCIDO DE LA MICROALGA *Chaetoceros gracilis* PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES*.

AUTORES: ANDREA PAOLA MEZA SANTOS, ASTRID JULIANA SEPULVEDA SOTO**.

PALABRAS CLAVES: Microalgas, pretratamiento, método organosolv, hidrólisis ácida, azúcares reductores totales (ART).

DESCRIPCIÓN

Se estudió por primera vez un proceso de pretratamiento basado en el método organosolv metanol-ácido a la biomasa de la microalga *Chaetoceros gracilis*, para la obtención de azúcares reductores totales (ART).

Los análisis se hicieron a través de un diseño central compuesto 2^3 , con 90% de confianza y tomando el tiempo de reacción [h], concentración de metanol [%v/v] y concentración de ácido[M] en el licor de pretratamiento como variables del proceso. Los resultados obtenidos del primer y segundo diseño experimental muestran como tendencia que el efecto de la concentración de metanol no favorece el pretratamiento, y que por el contrario el aumento del tiempo de reacción y la concentración de ácido en el licor benefician la obtención de ART. Del primer diseño resulta un 3.41% de ART sobre la biomasa seca a 50[%v/v] metanol, 0.075 [M] de ácido y 3.68 [h] de reacción. Teniendo en cuenta estos resultados se decide para el segundo diseño ampliar los rangos de experimentación tanto de tiempo de reacción como de concentración de ácido y disminuir la concentración de metanol. Se obtuvo de éste un 15.79% de ART a 3.32[%v/v] de metanol, 0.5[M] de ácido y 200 [min] de reacción. Con el fin de mejorar estos resultados se hizo una nueva combinación de los rangos de las variables del segundo diseño de experimentos obteniéndose a 247[min] de reacción, 3,32 [%v/v] de metanol y 0.6 [M] de ácido en el licor, un 17% de ART, lo que corresponde a rendimientos hasta de un 100% con respecto a los resultados reportados por la Universidad de Antioquia para carbohidratos presentes en *Chaetoceros gracilis*. Se demostró que el pretratamiento es eficiente para la obtención de ART, además de que es necesario el uso de pequeñas concentraciones de metanol en el licor para lograr altos rendimientos de extracción.

* Proyecto de grado

**Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Dr. Sc. VIATCHESLAV KAFAROV y Biólogo Andrés Fernando Barajas. Codirector: Msc. Laura Liliana Garzón.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF METHANOL-ACID PRETREATMENT the microalgae *Chaetoceros gracilis* FOR OBTAINING TOTAL REDUCING SUGAR *

AUTHORS: ANDREA PAOLA MEZA SANTOS, ASTRID JULIANA SEPULVEDA SOTO**.

KEY WORDS: Microalgae, pretreatment, organosolv method, acid hydrolysis, total reducing sugars (TRS).

DESCRIPTION

It was first studied pre-treatment process based on the method Organosolv methanol-acid to the biomass of the microalgae *Chaetoceros gracilis*, to obtain total reducing sugars (TRS).

Analysis was via a central composite design 2^3 , with 90% confidence and taking the reaction time [h], methanol concentration [% v / v] and acid concentration [M] in the pretreatment liquor as process variables. The results of the first and second experimental design show a tendency that the effect of methanol concentration does not favor the pretreatment, and on the contrary the increase of reaction time and concentration of acid in the liquor benefit TRS's obtaining. From the first design results in a 3.41% of TRS on the dry biomass to 50 [% v / v] methanol, 0.075 [M] acid and 3.68 [h] reaction. Given these results it is decided for the second design to extend the ranges of experimentation of both reaction time and acid concentration and decrease the concentration of methanol. It was obtained 15.79% of TRS to 3.32 [% v / v] methanol, 0.5 [M] acid and 200 [min] reaction. In order to improve these results a new combination in the ranks of the variables of the second design of experiments was done obtained at 247 [min] reaction, 3.32 [% v / v] methanol and 0.6 [M] acid in the liquor, 17% of TRS, which corresponds to yields of up to 100% with respect to the results reported by the University of Antioquia for carbohydrates present in *Chaetoceros gracilis*. It demonstrated that pretreatment is efficient for obtaining TRS, besides it is necessary to use small concentrations of methanol in the liquor for achieving high extraction yields

* Degree Project.

** Faculty of physical-chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director Dr. Sc. VIATCHESLAV KAFAROV y Biologist Andrés Fernando Barajas. Codirector: Msc. Laura Liliانا Garzón.

INTRODUCCIÓN

El constante cambio en los precios de los combustibles fósiles, la incertidumbre del agotamiento de las reservas de crudo en los pozos petroleros y la liberación de grandes cantidades de gases contaminantes que estos combustibles emiten a la atmósfera, han tenido como consecuencia la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías que promuevan la degradación y aprovechamiento de biomasa vegetal (material lignocelulósico) que no sean base de alimentos, para la obtención de biocombustibles [1].

En esta búsqueda, el Ministerio de Agricultura junto con el Instituto Colombiano de petróleo (ICP), el Instituto de Morrosquillo y la Universidad Industrial de Santander, han comenzado a estudiar a las microalgas como potencial materia prima para desarrollar nuevas fuentes de energía, ya que estos microorganismos no requieren de grandes extensiones para su cultivo, además de reducir las concentraciones de gases de efecto invernadero, ya que captan el dióxido de carbono como nutriente para su crecimiento [1].

En la literatura no se reportan pretratamientos aplicados a las microalgas que puedan extraer los azúcares para la obtención de los biocombustibles, por tal motivo en esta investigación se adecua un pretratamiento aplicado a la biomasa lignocelulósica (método organosolv metanol-ácido) como pretratamiento para la obtención de azúcares reductores a partir de la biomasa de la microalga *Chaetoceros gracilis*, reportando los resultados obtenidos de concentración de azúcares reductores totales (ART), cuya cantidad se determinó colorimétricamente por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS).

1. MARCO TEÓRICO

Como consecuencia de la utilización de diferentes materias primas para la obtención de nuevas fuentes de energía, ha sido necesaria la implementación de técnicas de procesamiento, que eran anteriormente utilizadas con otros fines; tal es el caso del proceso organosolv que se utilizaba en la industria del papel para realizar el pulpeo del material lignocelulósico [2].

1.1 Microalgas

Las Microalgas son microorganismos fotosintéticos, no vasculares que contienen clorofila, poseen estructuras reproductoras simples y flotan libremente, pero con movilidad limitada; según la obtención de sus nutrientes pueden ser autótrofas, auxótrofas y heterótrofas. Su reproducción puede ser asexual, por división longitudinal o transversal, o por medio de esporas y sexual. Estos microorganismos son capaces de utilizar la energía solar para combinar agua con dióxido de carbono para su reproducción, además, debido a que las células crecen en suspensión acuosa, tienen un acceso más eficiente de agua, CO₂, y otros nutrientes [3].

1.1.1. Clasificación de las Microalgas

En general, las clases de algas existentes más conocidas son [4]:

- Diatomea: Son microalgas unicelulares o coloniales de plastos marrones o amarillos. Las células se encuentran impregnadas en sílice formando valvas que suelen situarse a modo de caja, y que pueden presentar una ornamentación característica de cada especie.

- Cloroficea: Son conocidas como algas verdes, con cloroplastos de color muy bien definidos, con formas y localizaciones celulares diferentes.
- Xantoficea: Conocidas como algas verde-amarillentas, como consecuencia de la presencia de xantofilas. Existe una amplia variabilidad morfológica, que va desde formas unicelulares, móviles e inmóviles, hasta formas filamentosas. Habita las aguas dulces y suelos, además de algunas especies marinas.

1.1.2 Composición química

La composición química de las microalgas varía dependiendo de la especie, época del año, nutrientes, temperatura, fotoperiodo, salinidad, fuente de carbono, intensidad y color de la luz entre otros. Según estudios realizados anteriormente en diferentes microalgas, se encontró una composición química promedio de: 30% proteína, 25% carbohidratos, 21% lípidos y lo demás de compuestos no clasificados [5].

- Proteínas: Los aminoácidos constituyen un 90-98% del total de la proteína. Las proporciones de aminoácidos individuales, no varían entre las diferentes especies de algas. La producción de proteínas depende de los requerimientos de la especie en particular y se ve afectado conforme aumenta o disminuye la cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo, debido a la relación nitrógeno:fósforo. [6]
- Carbohidratos: Aunque no se reporta información muy detallada al respecto, los monosacáridos y oligosacáridos constituyen del 45-90% de la fracción total de carbohidratos, las proporciones individuales de estos, varía considerablemente en las diferentes especies de alga. Los principales azúcares son glucosa, galactosa, manosa, y ribosa, con otros azúcares en proporciones variables. [7]

Los carbohidratos presentes en células de diatomeas son reservas de polisacáridos y constituyentes de la pared celular [8].

En general, el contenido de carbohidratos en la célula se ve afectado por la intensidad de luz y por la fuente y concentración de nitrógeno, que al aumentar hace que aumente también el contenido total de carbohidratos. [5]

Tabla 1. Composición química de diferentes especies de microalgas.[9]

Especies	Proteína (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
<i>Euglena Gracilis</i>	39–61	14–20	14–18
<i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	48	21	17
<i>Chlorella Pyrenoidosa</i>	57	2	26
<i>Chlorella Vulgaris</i>	51–58	14–22	12–17
<i>Chaetoceros Gracilis</i>	23.94	8.69	19.01
<i>Dunaliella Salina</i>	57	6	32
<i>Spirulina Máxima</i>	60–71	6–7	13–16
<i>Spirulina Platensis</i>	46–63	4–9	8–14
<i>Scenedesmus Obliquus</i>	50–56	12–14	10–17
<i>Schizochytrium sp</i>	39.2	32.2	13.3
<i>Tetraselmis chui</i>	49.2	10.6	16.4

- Lípidos: Se compone principalmente de lípidos como ésteres de glicerol y ácidos grasos y su composición puede variar por factores como la combinación de luz, nutrientes, nitrógeno y temperatura. [10]

- **Minerales:** En peso seco puede constituir entre el 6 y el 39%. Los iones de mayor importancia contenidos en las microalgas son el fósforo, sílica (diatomeas), magnesio, calcio, sodio, potasio, cloro y zinc, manganeso y cobre [10].

1.2 *Chaetoceros gracilis*

Chaetoceros gracilis Pantocsek 1890 es una alga q pertenece al grupo de las diatomeas cuya forma es rectangular y sus dimensiones son de 8-12 x 7-10 µm. Tienen tolerancia a aguas hasta de 40°C. Sus valores nutricionales presentan alrededor de un 23,94% de proteínas, 8,69% de lípidos y 19,01% de carbohidratos [11].

Diversos estudios han mostrado que la pared celular de las diatomeas está formada por sílica amorfa, la cual está asociada con material orgánico que a menudo forma una piel alrededor de la sílica. *Ch gracilis* está compuesta principalmente por tres monómeros: ramosa, fucosa y galactosa y se ha encontrado particularmente conveniente para la producción de polisacáridos extracelulares en cultivos a gran escala. [12]

1.3 Pretratamiento

Se le denomina pretratamiento al conjunto de acciones para mejorar el rendimiento en la obtención de azúcares fermentables desde la biomasa inicial. La biomasa lignocelulósica suele ser un sistema recalcitrante debido a la fuerte unión entre los constituyentes de la pared celular. Los pretratamientos están orientados en general a quebrar la barrera de la lignina y romper la estructura de la celulosa, o pueden limitarse simplemente, a generar un aumento de las regiones amorfas de la celulosa lo que conlleva a la mejora de la hidrólisis.[13] Algunos pretratamientos llevan a la biomasa a sufrir hidrólisis en el mismo paso sin degradación de los azúcares, este tipo de pretratamientos eliminarían la posterior etapa de hidrólisis enzimática y los azúcares obtenidos serían directamente fermentados,

Existen diversos tipos de pretratamiento, como se relaciona en la siguiente tabla:

Tabla 2. Tipos de pretratamiento [14]

TIPOS DE PRETRATAMIENTO			
TIPO	PROCESO	CARACTERÍSTICA	
FÍSICOS	Fragmentación mecánica	Procesos altamente demandantes de energía que elevan costos en el pretratamiento.	
	Pirolisis		
FÍSICO-QUÍMICAS	Explosión con vapor (auto-hidrólisis)		
	Explosión de fibra con amoníaco (AFEX)		
	Explosión con CO ₂		
QUÍMICAS	Ozonólisis		Pretratamiento secundario de menor demanda de energía pero mayor tiempo de tratamiento.
	Hidrólisis ácida		
	Hidrólisis alcalina		
	Delignificación oxidativa		
	Proceso Organosolv		
BIOLÓGICO	Uso de microorganismos		
	Procesos enzimáticos		

1.3.1 Organosolv Metanol-ácido

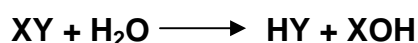
Este pretratamiento tiene como objetivo la delignificación de materiales lignocelulósicos, usando solventes orgánicos para la disolución de lignina y fracción de hemicelulosa contenida en la materia prima y puede llevarse a cabo además, tanto en procesos catalizados como en procesos no catalizados [2].

Los solventes orgánicos más usados en los procesos de delignificación son el metanol y el etanol acuosos ya que han mostrado mayor potencial de aplicación a lo largo de varias investigaciones (Kyosti, 1990), además, se ha encontrado la influencia de variables tales como proporción solvente/agua, cantidad y tipo de catalizador, temperatura y tipo de material lignocelulósico sobre los resultados de dicho pretratamiento. La adición de un catalizador al proceso resulta benéfica con respecto a algunos aspectos, sobre los procesos no catalizados. La adición de catálisis ácida permite el uso de temperaturas de hidrólisis bajas con respecto a los sistemas no catalizados. [15]

Se ha encontrado que el uso de un sistema metanol/agua como solvente permite que la delignificación ocurra a menores temperaturas que las correspondientes a sistemas etanol/agua, probablemente debido a la alta solubilidad de ligninas de bajo peso molecular en el metanol.[2]

1.4 Hidrólisis

El término hidrólisis hace referencia a un proceso químico en el que una molécula se divide en dos partes por la acción de una molécula de agua. Un fragmento de la molécula gana un ión hidrógeno (H) de la molécula de agua, y el otro fragmento recoge el grupo hidroxilo (OH) [16].



Sin embargo, en condiciones normales esto sólo ocurre en algunas reacciones entre el agua y compuestos orgánicos, y se hace entonces necesaria la adición de ácidos o bases fuertes como catalizadores a fin de lograr la hidrólisis, donde el agua por si sola no tiene efecto. La hidrólisis a través de soluciones ácidas rompe enlaces glucosídicos e introduce los elementos del agua en los puntos

de ruptura para dar lugar a la formación progresiva de moléculas de maltosa, glucosa, dextrinas y otros azúcares [17].

Kirchoff, en 1811 fue el primer químico en convertir un almidón en un monosacárido a través de una hidrólisis ácida. A partir de entonces, se han desarrollado diversas modificaciones y mejoras alrededor de este proceso, para su aplicación en diversas áreas industriales [18].

1.5 Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Es un método colorimétrico, que se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo), cuya presencia puede detectarse por lectura de la absorbancia en la zona de 540-570nm. [19]

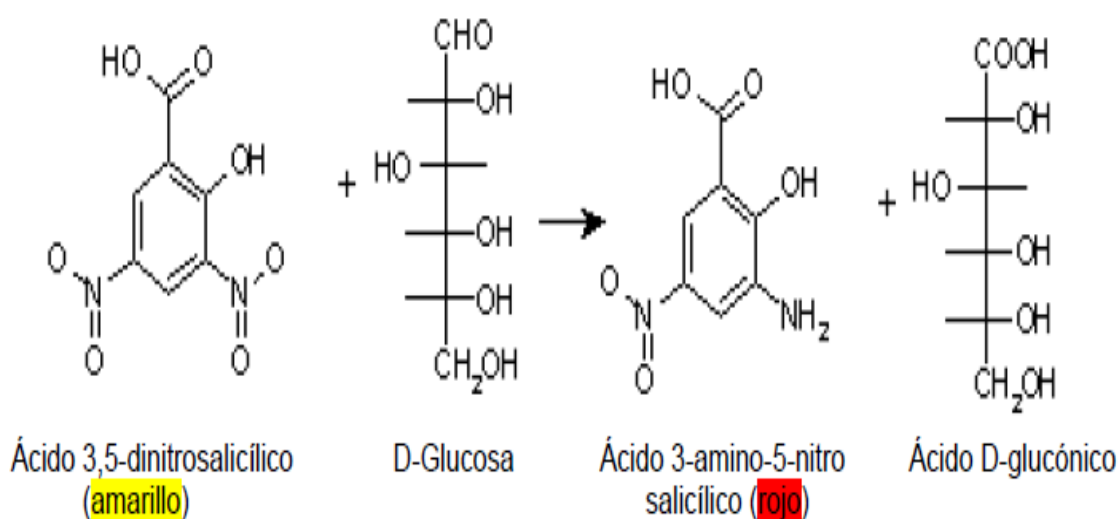


Figura 1. Reacción DNS [20]

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos

Para todo el proceso de experimentación se utilizó agua destilada y los reactivos que se relacionan a continuación:

Tabla 3. Lista de reactivos.

Reactivo	Fórmula Molecular	Masa molecular (g.mol ⁻¹)	Pureza
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	98.08	97% v/v
Metanol	CH ₃ OH	32.04	99,8% v/v
Ácido 3,5-di-nitrosalicílico	C ₇ H ₄ N ₂ O ₇	228.12	99% v/v
Carbonato de Calcio	CaCO ₃	100.1	98-99% p
D-(+)- glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	100% v/v

2.1.2 Materia prima

El Instituto Morrosquillo fue el encargado del suministro de materia prima (*Ch gracilis*) cultivada en un medio enriquecido con agua de mar (Medio f/2) [21], cosechada por la adición de un agente floculante (150 ppm FeCL₃) y finalmente secada a exposición solar.

El Instituto Colombiano de Petróleo (ICP) en cooperación con la Universidad de Antioquia, caracterizó la biomasa y reporta dentro de sus resultados un contenido de ceniza de 59.88%, 17.27% de carbohidratos, 13.3% de humedad, 9.88% de proteínas y un muy bajo contenido de lípidos.

2.2. Equipos

Para el desarrollo experimental del presente trabajo, se implementaron los siguientes equipos:

Tabla 4. Equipos utilizados durante la experimentación.

EQUIPO	MARCA
Espectrofotómetro	Pharo 300 de Merk
Centrifuga de pie	Modelo 5-25, marca M.L.W
Balanza analítica	Gravimetrics AC
Autoclave cilíndrica 25L	Mod 25-X
Medidor de pH	Shooh-Instruments Gmbh
Estufa con recirculación de aire WTC	Binder
Bomba de inmersión serie 305335	Cole-Parmer
Micropipetas	Brand
Plancha de calentamiento modelo MSH-20D	Wisestir
Rotoevaporador	Hahnshin scientific Co
Horno mufla modelo L-100	Modelo L-100, marca M.L.W

2.3 Procedimiento experimental

En general, el procedimiento experimental de este estudio se divide en dos etapas principales, pretratamiento e hidrólisis.

La primera etapa finaliza en el momento en que la biomasa después del pretratamiento es preparada para pasar a su segunda fase (Hidrólisis).

2.3.1 Pretratamiento

La materia prima suministrada para el pretratamiento es previamente secada a exposición solar y macerada antes de entrar en esta etapa.

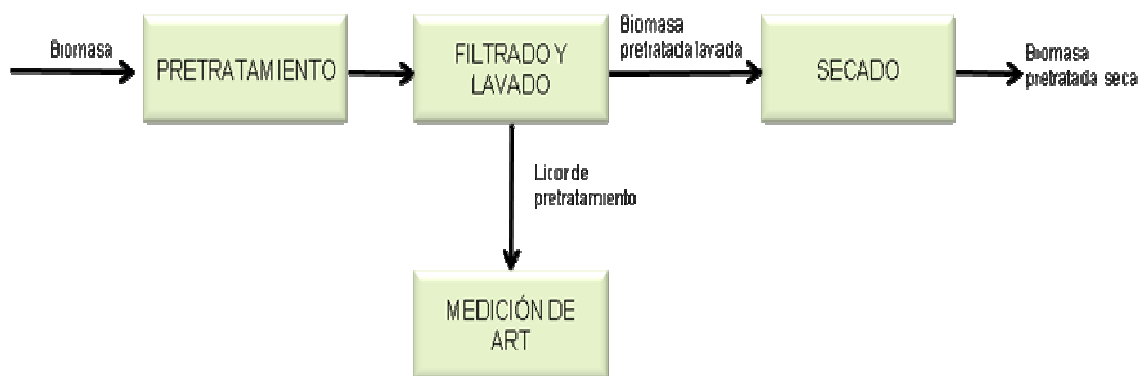


Figura 2. Diagrama de bloques Etapa de Pretratamiento.

2.3.1.1 Preparación del Licor

Se prepararon 200 mL de Licor (Metanol + Agua) con ácido sulfúrico (Catalizador) a las concentraciones proporcionadas por el diseño de experimentos.

2.3.1.2 Autoclavado

Se pesaron 20g de biomasa que se adicionaron al licor previamente preparado para cada ensayo. Esta mezcla fue llevada a un autoclave a 15 psi y 121 °C, durante el tiempo de reacción especificado para cada corrida.

2.3.1.3 Filtrado y Lavado

Luego de la cocción en autoclave, se separó el licor de la biomasa pretratada por medio de filtración al vacío. La biomasa separada fue lavada con agua destilada.

2.3.1.4 Secado

La biomasa pretratada y previamente lavada fue secada en una estufa a 105°C durante 12 horas según norma NREL/TP-510-42621 (Anexo A).

2.3.1.5 Medición de concentración de azúcares reductores totales ART

Antes de llevar a cabo el método DNS, se hizo necesario para cada prueba la neutralización con carbonato de calcio, ya que el uso de ácido en el pretratamiento hace que el licor presente licores bajos de pH, lo que puede interferir en la reacción que se lleva a cabo durante la aplicación del método ya mencionado y como consecuencia en la medición de las absorbancias.

La concentración de ART fue determinada de acuerdo con el método del Acido Dinitrosalicílico descrito por Miller (1959) (Anexo B).

Para la determinación de los ART, se mezcló 0,5mL de cada Licor con 0,5mL de DNS en tubos de ensayo. Esta mezcla se mantuvo durante 5 minutos en un baño a 95°C. Posteriormente se sumergieron en un baño con hielo, se le adicionó a cada muestra 5mL de agua destilada y se agitó para homogenización de la mezcla.

Las lecturas de absorbancia se hicieron en el espectrofotómetro a 540nm, y su calibración se hizo con un “blanco”, que consistió en la mezcla de DNS con agua destilada.

2.3.2 Hidrólisis ácida

Este procedimiento se realiza de acuerdo al numeral 10.1 de la norma NREL/TP-510-42618 (Anexo C)

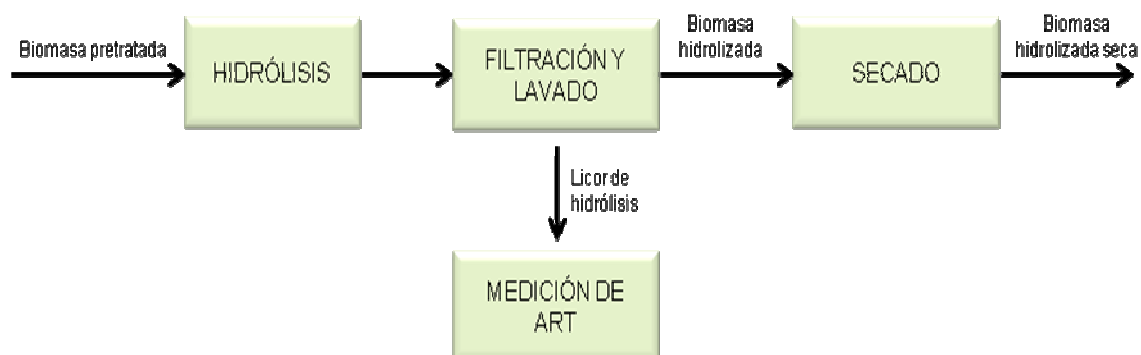


Figura 3. Diagrama de bloques, etapa de hidrólisis.

2.3.2.1 Prehidrólisis

Se pesó 1g de biomasa pretratada seca y se le adicionó 10mL de ácido sulfúrico al 72% en tubos de ensayo, se mantuvo la mezcla en un baño de agua a 30°C durante una hora, agitando cada 10 min.

2.3.2.2 Hidrólisis

La mezcla se diluyó con 280mL de agua destilada, y se autoclavó (15 psi, 121 °C) durante 1 h.

2.3.2.3 Filtrado, Lavado, Secado y Determinación de ART

Se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en las secciones 2.1.3.3 a 2.1.3.5

2.3.3 Diseño Experimental del Pretratamiento:

Con el fin de evitar gastos excesivos de reactivos por realización de grandes cantidades de experimentos, se plantea realizar el estudio de liberación de azúcares en algas por un diseño factorial 2^3 central compuesto. Este diseño se plantea con la finalidad de barrer una mayor área de respuesta [21], donde fueron estudiadas 3 variables del proceso: Concentración de Metanol en el licor (% v/v), concentración H_2SO_4 (M) y tiempo (min)

2.3.4 Análisis de resultados a través de STATITICA 7.0

Luego de cuantificar los azúcares reductores totales, se elaboró una superficie de respuesta del pretratamiento junto con los datos del diseño central compuesto donde el porcentaje de ART fue analizado en función de las variables del diseño por medio del programa computacional STATITICA 7.0.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Cálculo de la humedad teórica de la biomasa

Siguiendo el procedimiento descrito por la norma NREL/TP-42621, se determinó la humedad para 1g de *Ch gracillis*. Se obtuvo un valor del 14.84%, el cual fue tenido en cuenta para todos los cálculos posteriores.

3.2 Resultados de la Hidrólisis de biomasa sin pretratar.

Se realizó una hidrólisis a la biomasa sin pretratar siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.3.2. El resultado obtenido en porcentaje de ART sobre la biomasa seca fue de 17% (Anexo F).

3.3 Efecto del floculante en la medición de ART por espectrofotometría.

Se realizaron pruebas a soluciones de glucosa con diferentes adiciones de concentraciones de floculante (50,150 y 300 ppm de FeCl_3), puestas a reaccionar con DNS y leídas en un espectrofotómetro a 540 nm. Los resultados mostraron que la cantidad de floculante en la medida de carbohidratos no tenía efecto significativo (ver anexo G).

3.4 Diseños experimentales de los pretratamiento

3.4.1 Diseño factorial 2^3 central compuesto No.1 del pretratamiento metanol-ácido.

Se realizó un diseño factorial 2^3 central compuesto donde fueron estudiadas 3 variables: concentración de metanol (% v/v), concentración de H_2SO_4 (M) y tiempo de cocción (h). Se presentan en la Tabla 5 los valores de los niveles para cada una de las variables de los experimentos.

Tabla 5. Rango de valores del Diseño Compuesto Central.

FACTORES	NIVELES				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Metanol [%v/v]	16.36	30	50	70	83.64
H2SO4 [M]	0.03	0.05	0.075	0.1	0.117
Tiempo [h]	0.32	1	2	3	3.68

La tabla 6 muestra la matriz de diseño experimental completo con los respectivos resultados de porcentaje de masa de ART liberado durante el desarrollo de cada ensayo, siendo los ensayos 15, 16 y 17 repeticiones del punto central. Se señala en la tabla referida, el mejor resultado obtenido tanto para el pretratamiento como para la hidrólisis, además del mejor resultado encontrado para el procedimiento completo (pretratamiento + hidrólisis).

Tabla 6. Matriz de diseño con los resultados de ART obtenidos durante el Pretratamiento y la hidrólisis.

# de Experimento	Metanol [%v/v]	H2SO4 [M]	Tiempo [h]	ART Licor de Pretratamiento [gART/gBS*]*100	ART en Hidrolizado [gART/gBS*]*100	ART totales (%)
1	30	0.05	1.00	0.54	2.06	2.61
2	30	0.05	3.00	1.55	4.73	6.28
3	30	0.10	1.00	1.84	1.74	3.58
4	30	0.10	3.00	1.30	4.25	5.55
5	70	0.05	1.00	0.58	1.68	2.26
6	70	0.05	3.00	1.25	4.76	6.01
7	70	0.10	1.00	0.95	1.54	2.49
8	70	0.10	3.00	0.77	4.51	5.28
9	16	0.075	2.00	2.60	2.36	4.97
10	84	0.075	2.00	0.39	3.22	3.61
11	50	0.03	2.00	0.62	2.02	2.64
12	50	0.12	2.00	1.46	1.98	3.44
13	50	0.075	0.32	1.04	5.23	6.26
14	50	0.075	3.68	3.41	4.00	7.41
15C	50	0.075	2.00	1.08	5.61	6.69
16C	50	0.075	2.00	1.01	3.07	4.08
17C	50	0.075	2.00	1.04	2.65	3.69

*BS: Biomasa seca.

Al comparar los resultados obtenidos de los ensayos 9 y 10 se puede observar que al aumentar la concentración de metanol, se obtiene una disminución en el porcentaje de ART logrado.

De los ensayos 13 y 14 se deduce un aumento significativo en la concentración de ART obtenido aumentando el tiempo de cocción. Un aumento considerable también se logra al aumentar la concentración de ácido en el licor (ensayos 11 y 12).

De los datos reportados en la Tabla 6, se puede decir en general que los mejores resultados se obtuvieron a altas concentraciones de ácido, bajas concentraciones de metanol y mayores tiempos de cocción. La etapa de hidrólisis ácida es realizada con la finalidad de cuantificar los azúcares resultantes en la etapa del pretratamiento, midiendo así el rendimiento del proceso (20%).

En los ítems siguientes se analiza el efecto de cada variable del proceso en la obtención de ART.

En la Figura 4 se muestra la cantidad de masa solubilizada para cada ensayo del pretratamiento. En general en todos los ensayos se observó una pérdida de biomasa alrededor de un 46%, donde el mayor porcentaje de masa solubilizada se observa en el ensayo 9.

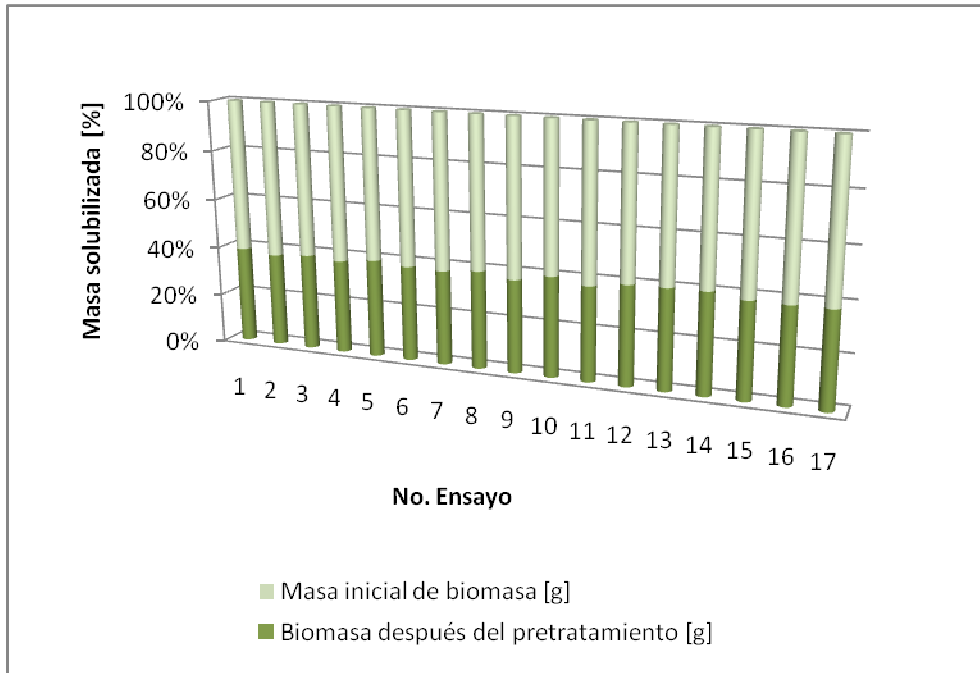


Figura 4. Masa solubilizada en el Pretratamiento

En la Figura 5 se muestra la cantidad de masa solubilizada para cada ensayo durante la hidrólisis. En general se observaron pérdidas de biomasa cercanas a un 85,20%, donde el mayor porcentaje de masa solubilizada se observa en el ensayo 10.

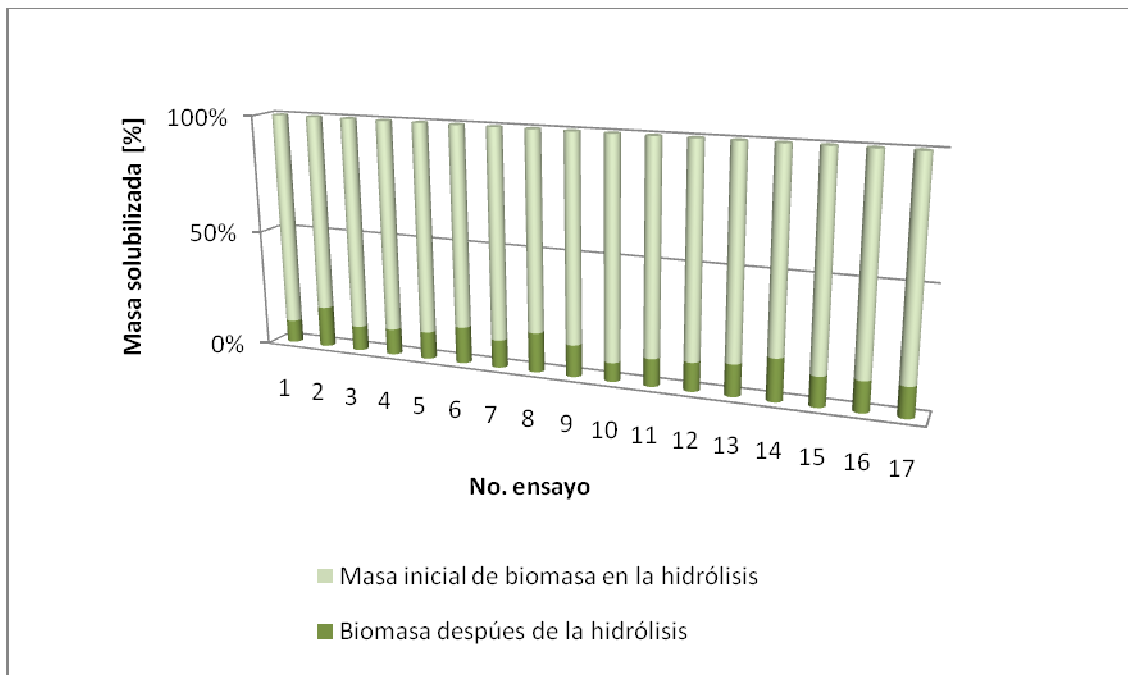


Figura 5. Masa solubilizada en la Hidrólisis

3.4.1.1 Análisis de la interacción entre las variables del pretratamiento

Las superficies de respuesta mostradas a continuación fueron realizadas utilizando el software STATISTICA 7.0, despreciando los efectos no significativos mostrados por el programa (Figura 6).

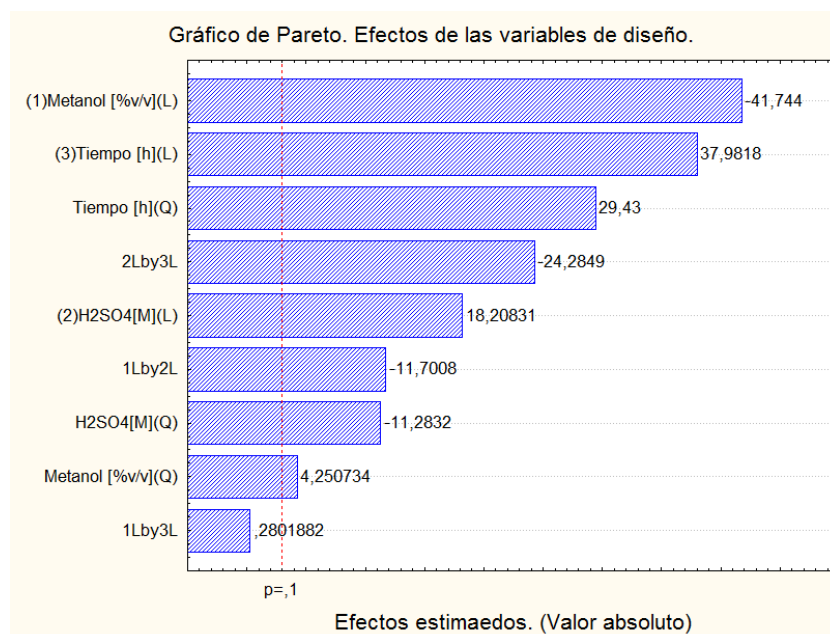


Figura 6. Gráfico de Pareto. Efectos de las variables de diseño.

La figura 6 muestra la significancia que tienen todas las variables y sus interacciones, sobre los porcentajes de ART obtenidos. Los bloques que no pasan el umbral (línea roja punteada), refieren a los efectos no significativos, que para este diseño es la interacción entre la concentración de metanol y el tiempo de reacción. Los efectos significativos que no favorecen (negativos) la obtención de ART son la concentración de metanol, el término de concentración de ácido cuadrático y las interacciones ácido-tiempo y metanol-ácido. Por el contrario, los efectos que favorecen la obtención de ART son el tiempo de reacción tanto lineal como cuadrático, la concentración de ácido y el término concentración de metanol cuadrático, siendo el más significativo de estos el efecto que tiene la variable tiempo sobre los resultados obtenidos.

3.4.1.1.1 Interacción Metanol-Ácido

La figura 7 muestra el efecto de la interacción entre las variables metanol y ácido, manteniendo el tiempo en el punto central del diseño. De acuerdo con esta figura, los rendimientos máximos de ART obtenidos (2 %ART) para este diseño se logran con mayor concentración de ácido y menor concentración de metanol contemplados en este diseño, además de predecir mayores liberaciones de ART con un aumento y una disminución de los rangos de trabajo de las variables respectivamente mencionadas. Las tendencias de la superficie de respuesta tanto para el punto máximo como para el punto mínimo de tiempo de cocción se muestran en el Anexo D.

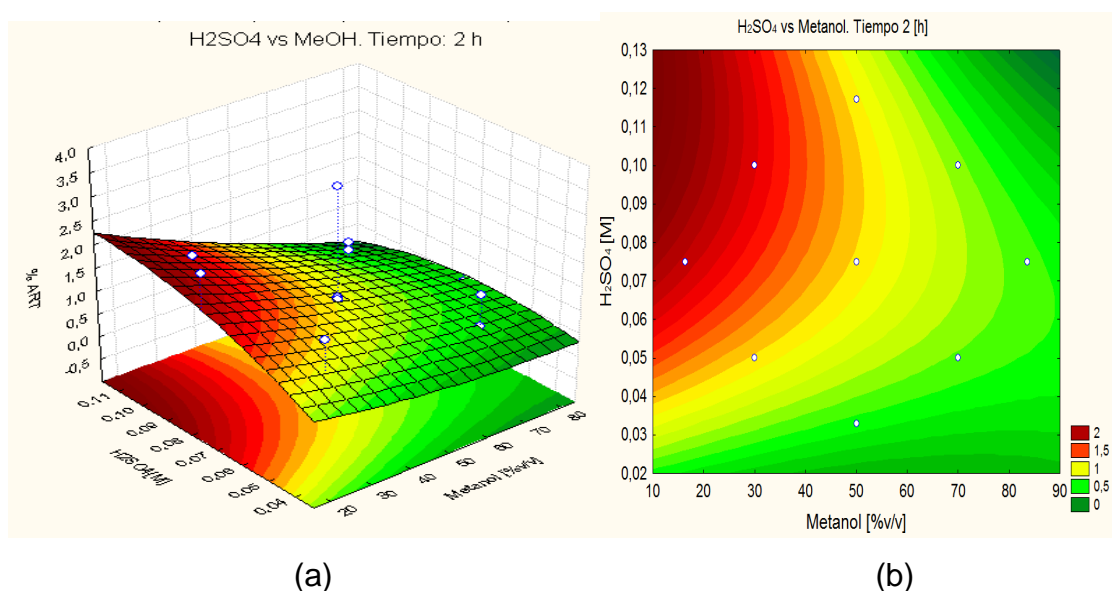


Figura 7. H₂SO₄ vs Metanol. Tiempo 2h. (a) superficie de respuesta (b) curva de nivel.

3.4.1.1.2 Interacción Metanol-Tiempo

La figura 8 muestra el efecto de la interacción entre la concentración de metanol y tiempo, manteniendo la concentración de ácido en el punto central del diseño. Se observa que la concentración de ART máxima para este análisis puede llegar a ser hasta de un 3% de ART y se encuentra en el extremo

superior del intervalo estudiado de tiempo y a menores concentraciones de metanol, por lo tanto se debe realizar nuevos ensayos aumentando el tiempo de reacción y disminuyendo la concentración de solvente. La misma tendencia se presenta cuando se grafican las superficies de respuesta en los puntos mínimo y máximo de H_2SO_4 (Anexo D).

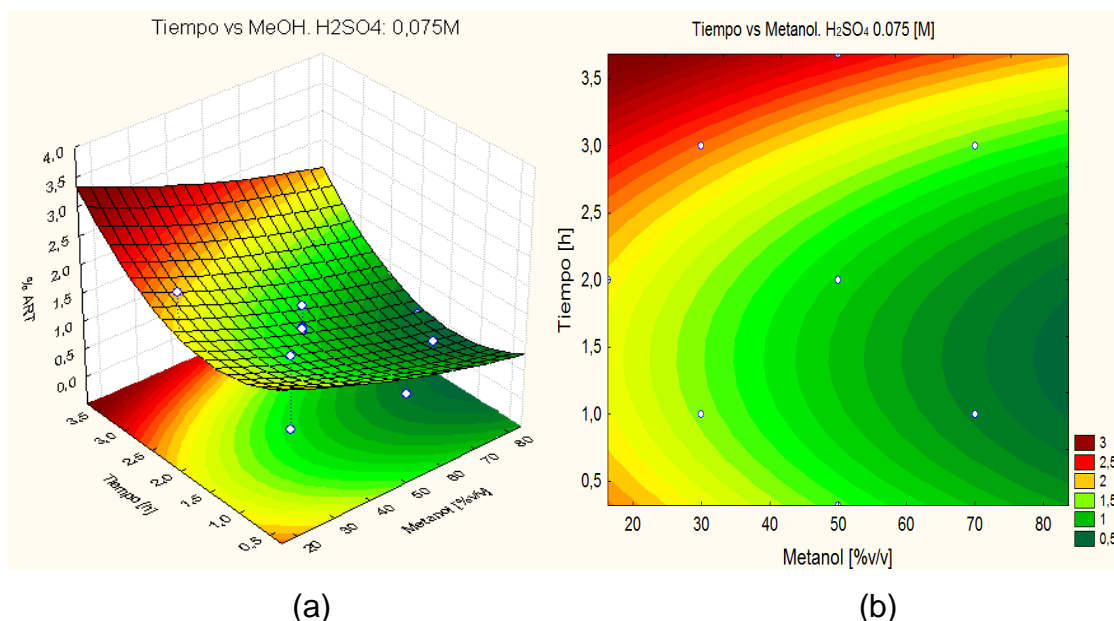


Figura 8. Tiempo vs Metanol. Concentración de H_2SO_4 : 0,075M. (a) Superficie de respuesta (b) curva de nivel.

3.4.1.1.3 Interacción Ácido-Tiempo

La figura 9 muestra el efecto de la interacción entre el tiempo de reacción y ácido manteniendo la concentración de metanol en el punto central del diseño. La gráfica muestra en general dos tendencias, la primera muestra rendimientos de ART hasta de 2.5% a mayor tiempo y menores concentraciones de ácido, y la segunda buenos rendimientos a menores rangos de tiempo y mayores concentraciones de H_2SO_4 (hasta 2% ART). Sin embargo la primera tendencia muestra un área roja mayor (mejores rendimientos de %ART) con respecto a la segunda tendencia. Lo que indica que sería bueno ampliar el rango de tiempo de reacción en el diseño de experimentos. Las tendencias de la superficie de

respuesta tanto para el punto máximo como para el punto mínimo del diseño con respecto a la concentración de metanol se muestran en el Anexo D.

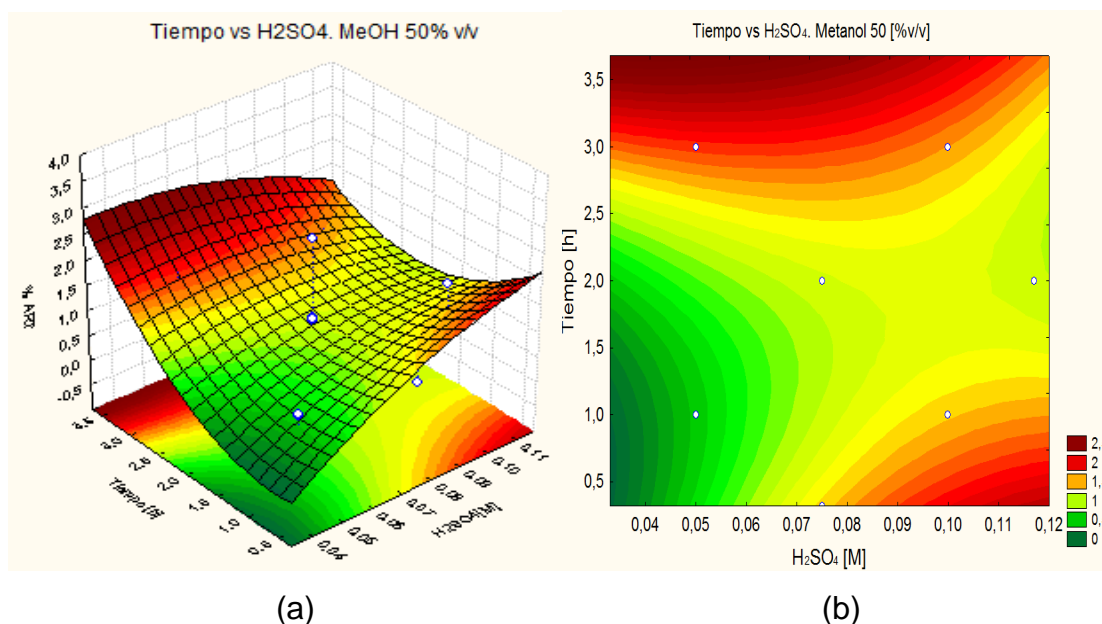


Figura 9. Tiempo vs H₂SO₄. Concentración de Metanol 50%v/v. (a) superficie de respuesta. (b) curva de nivel.

3.4.2 Diseño factorial 2³ central compuesto No.2 del pretratamiento.

Con base en el análisis del primer diseño, se determinó ampliar los rangos de las variables de proceso concentración de ácido y tiempo y disminuir la concentración de metanol en el licor, ya que a estas condiciones se obtuvo un mayor porcentaje de ART en las mediciones.

3.4.2.1 Diseño factorial 2³ central compuesto

Para la mejora en los resultados del pretratamiento, se planteó un diseño factorial 2³ central compuesto. El diseño estudió las mismas variables analizadas en el diseño experimental número 1.

La Tabla 8 muestra la matriz del diseño experimental número 2, determinado por el programa computacional STATISTICA 7.0. La metodología experimental

del pretratamiento se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.

Tabla 7. Rango de valores del diseño central compuesto.

FACTORES	NIVELES				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68
Metanol [%v/v]	0	3.32	8.18	13.04	16.36
H2SO4 [M]	0.1	0.202	0.35	0.5	0.6
Tiempo [min]	15	62.04	131.02	200	247

La tabla 8 muestra el porcentaje de masa de ART liberado durante el desarrollo del segundo diseño experimental, siendo los ensayos 15, 16 y 17 repeticiones del punto central. Se señalan en la tabla, los mejor resultados obtenidos tanto para el pretratamiento como para la hidrólisis.

Tabla 8. Matriz de diseño factorial 2^3 compuesto central con tres puntos centrales y variable de respuesta de cada etapa

# de Experimento	Metanol [%v/v]	H2SO4 [M]	Tiempo [h]	ART Licor de Pretratamiento [gART/gBS*]*100	ART en Hidrolizado [gART/gBS*]*100	ART totales (%)
1	3.32	0.20	62.04	4.92	4.35	9.27
2	3.32	0.20	200.00	9.11	0.96	10.07
3	3.32	0.50	62.04	9.30	3.29	12.59
4	3.32	0.50	200.00	15.79	0.92	16.71
5	13.04	0.20	62.04	4.32	3.47	7.79
6	13.04	0.20	200.00	8.48	0.58	9.06
7	13.04	0.50	62.04	6.90	3.28	10.17
8	13.04	0.50	200.00	14.85	0.25	15.10
9	0.00	0.35	131.02	9.74	2.87	12.62
10	16.36	0.35	131.02	10.45	2.12	12.57
11	8.18	0.10	131.02	3.41	2.99	6.41
12	8.18	0.60	131.02	10.39	2.65	13.04
13	8.18	0.35	15.00	2.62	2.62	5.24

14	8.18	0.35	247.00	14.03	0.23	14.26
15C	8.18	0.35	131.02	7.74	3.93	11.66
16C	8.18	0.35	131.02	7.13	4.17	11.30
17C	8.18	0.35	131.02	7.00	3.51	10.51

*BS: Biomasa seca.

En la tabla 8 se puede observar que el mayor porcentaje de ART obtenido en el pretratamiento se registra el ensayo 4, siendo este valor de 15,79% ART.

Al comparar los resultados obtenidos de los ensayos 9 y 10 se puede observar que al disminuir la concentración de metanol y manteniendo constantes la concentración de ácido y el tiempo, se obtienen menores porcentajes de ART (de 10.45 a 9.74%), este resultado difiere de los resultados obtenidos en el diseño anterior, de lo que se puede deducir que es necesario el uso de metanol en el pretratamiento, aunque en concentraciones pequeñas (entre 0 y 16%v/v).

De los ensayos 13 y 14 se deduce un aumento significativo (de 2.62 a 14.03%) en la liberación de ART obtenido aumentando el tiempo de reacción en la etapa de pretratamiento y manteniendo constantes las concentraciones de ácido y metanol. Un aumento considerable (de 3.41 a 10.39% de ART) se logra también al aumentar la concentración de ácido en el licor (ensayos 11 y 12), al mantener constantes la concentración de metanol y el tiempo de reacción.

Los resultados muestran además que el porcentaje de ART en el hidrolizado, disminuye cuando son liberados mayor cantidad de ART en la etapa de pretratamiento, lo que confirma un aumento en el rendimiento de esta etapa (93%).

La Figura 9 muestra una comparación entre los porcentajes de ART obtenidos en las dos etapas principales del proceso, pretratamiento e hidrólisis, y se puede observar con mayor claridad el análisis hecho anteriormente.

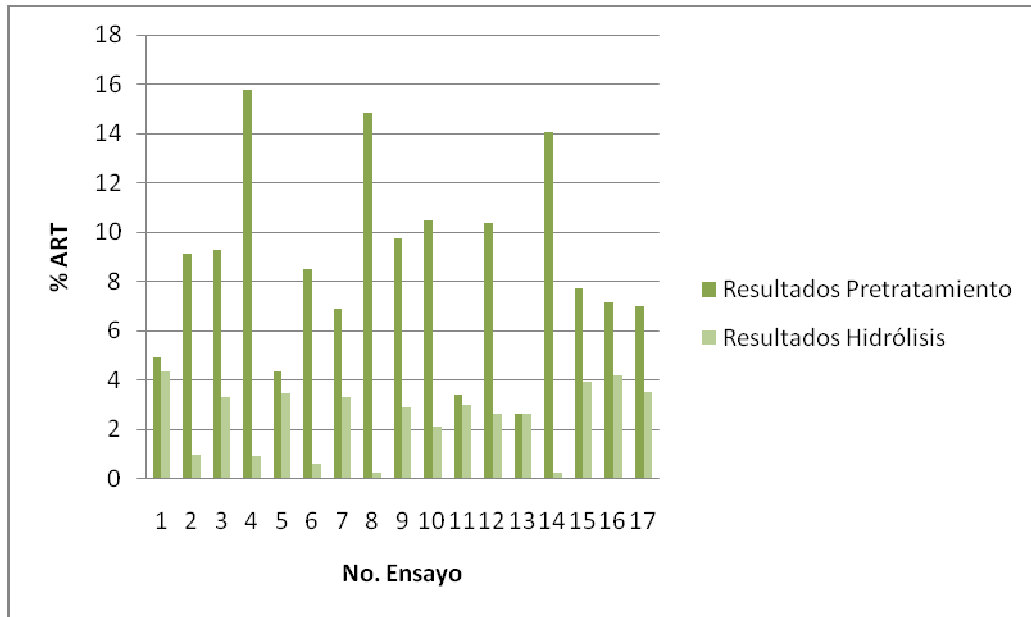


Figura 10. Comparación resultados de pretratamiento e hidrólisis

3.4.2.1 Análisis de la interacción entre las variables del pretratamiento

Las superficies de respuesta mostradas a continuación fueron realizadas utilizando el software STATISTICA 7.0, despreciando los efectos no significativos mostrados por el programa.

3.4.2.1.1 Interacción Metanol-Ácido

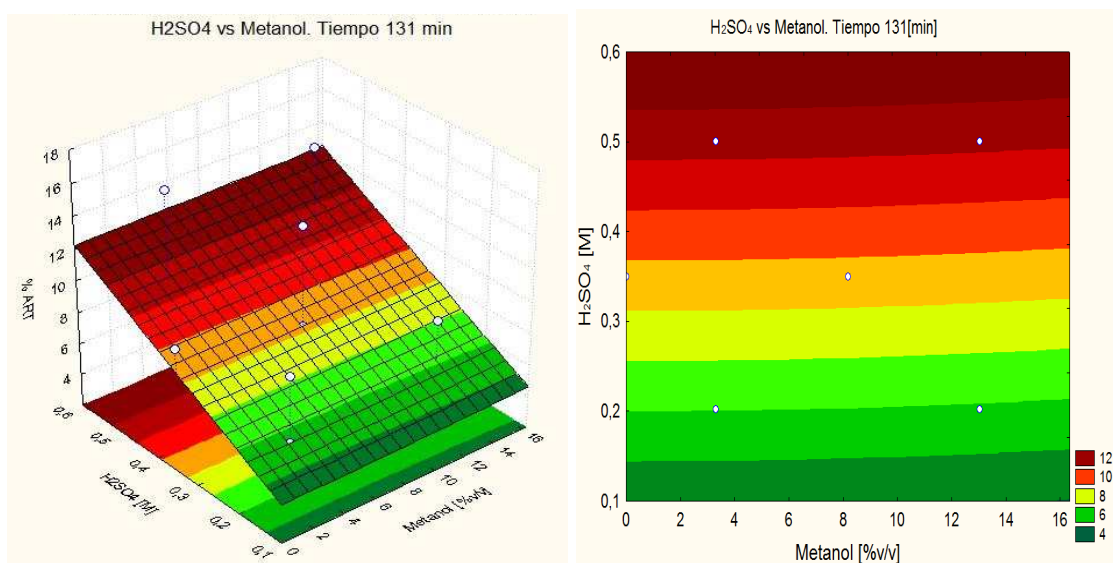


Figura 11. Superficie de respuesta H₂SO₄ vs Metanol. Tiempo 131min.

La figura 10 presenta la superficie de respuesta entre las variables metanol y ácido, manteniendo el tiempo en el punto central del diseño. De acuerdo con esta figura, se pueden alcanzar rendimientos hasta de un 12% de ART en un tiempo de 131 min, dentro de los rangos establecidos para las concentraciones de ácido y metanol indicadas en el diseño. Se puede inferir con respecto al diseño anterior, que al aumentar las concentraciones de ácido, se puede aumentar significativamente el porcentaje de ART obtenido sin tener significancia la cantidad de metanol empleada. Esta misma tendencia se observa al graficar la superficie de respuesta a altos y bajos tiempos (ver anexo E).

3.4.2.1.2 Interacción Metanol-Tiempo

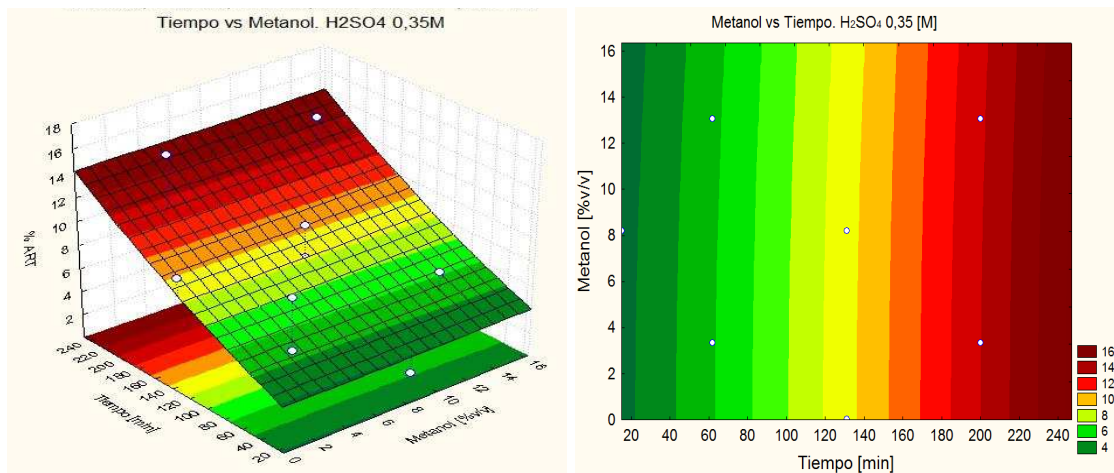


Figura 12. Superficie de respuesta Tiempo vs metanol. Concentración de H_2SO_4 : 0.35M.

La figura 11 muestra el efecto de la interacción entre las variables metanol y tiempo, manteniendo la concentración de ácido en el punto central del diseño. De acuerdo a la gráfica se puede deducir que el mayor porcentaje de ART posible dentro de este análisis es de 14%. Los resultados mejoran en la medida en que aumenta el tiempo de cocción, la concentración de metanol en el licor

no tiene un efecto significativo en los resultados y la tendencia de estos es igual para diferentes concentraciones de ácido.

3.4.2.1.3 Interacción Ácido-Tiempo

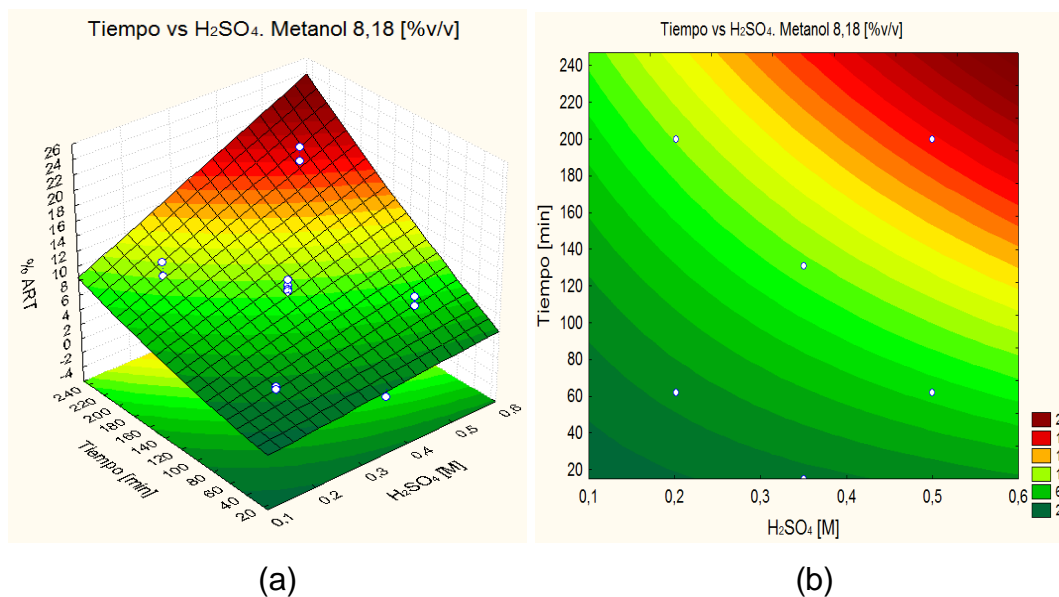


Figura 13. Tiempo vs H₂SO₄. Concentración de Metanol 8.18%v/v.(a) Superficie de respuesta. (b) curva de nivel

La figura 12 muestra el efecto de la interacción entre las variables tiempo y ácido manteniendo la concentración de metanol en el punto central del diseño. Se muestra al igual que las figuras anteriores que los porcentajes de ART obtenidos aumentan hasta un 22% al aumentar el tiempo de reacción y la concentración de ácido en el licor. Este comportamiento se mantiene al trazar la superficie de respuesta tanto a altas y como a bajas concentraciones de metanol (ver anexo E).

La tabla 9 muestra tanto los efectos significativos como los no significativos del modelo descrito por el diseño de experimentos. Los efectos señalados refieren

a aquellos no significativos sobre el desarrollo experimental. La variable que afecta en mayor medida y con un efecto positivo los resultados es el tiempo de reacción.

Tabla 9. Matriz de Efectos

	Efecto	Error puro	t(2)	p	-90.% Cnf.Limt	+90.% Cnf.Limt	Coeff.
Media	7.26	0.23	31.87	9.83E-04	6.59	7.92	7.26
(1)METANOL (L)	-0.49	0.21	-2.35	1.45E-01	-1.12	0.13	-0.25
METANOL (Q)	2.29	0.24	9.73	1.04E-02	1.60	2.98	1.14
(2)ACIDO (L)	4.65	0.21	21.75	2.11E-03	4.03	5.28	2.33
ACIDO (Q)	0.03	0.24	0.14	9.02E-01	-0.65	0.72	0.02
(3)TIEMPO (L)	6.15	0.21	28.76	1.21E-03	5.53	6.78	3.08
TIEMPO (Q)	1.04	0.24	4.41	4.78E-02	0.35	1.73	0.52
1L by 2L	-0.53	0.28	-1.91	1.96E-01	-1.35	0.28	-0.27
1L by 3L	0.36	0.28	1.28	3.29E-01	-0.46	1.17	0.18
2L by 3L	1.52	0.28	5.45	3.20E-02	0.71	2.34	0.76

La ecuación 1 muestra el modelo completo obtenido con los valores de los coeficientes mostrados en la tabla 9. Los valores de esta ecuación se encuentran en valores codificados.

$$\%ART = 7.26 - 0.25M + 1.14M^2 + 2.33A + 0.02A^2 + 3.08T + 0.52T^2 - 0.27MA + 0.18MT + 0.76AT$$

Ecuación (1)

Donde:

M: metanol

A: ácido

T: tiempo

Para validar este modelo es necesario realizar el test de la distribución F. Para que el modelo pueda ser usado para fines predictivos es necesario que cumpla las dos condiciones; una relacionada con la regresión y otra con la falta de ajuste. A continuación se presenta en la tabla 10 El análisis de variancia (ANOVA) donde son calculados los Teste F por medio del modelo presentado en la ecuación 1.

Tabla 10. Análisis de la varianza

Fuente de variación	Suma Cuadrática	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Teste F
Regresión (R)	226.0862	9	25.1207	30.5514
resíduo (r)	5.7557	7	0.8222	
falta de ajuste (faj)	5.4435	5	1.0887	6.9744
error puro (ep)	0.3122	2	0.1561	
Total (T)	231.8420	16		
% variación explicada (R ²)	226.0863	9	25.1207	

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

$$F_{(\text{regresión calculado})} > F_{(\text{regresión teórico})_{9,7}} : 30,820539 > 2.724$$

$$F_{(\text{Falta ajuste calculado})} < F_{(\text{Falta de ajuste teórico})_{5,2}} : 6,911150 < 9.2926$$

Al analizar los dos resultados del prueba F obtenidos, se puede percibir que el valor de la primera y de la segunda condición son aprobadas, tanto para la regresión como para la falta de ajuste, concluyendo así que la ecuación del modelo cuadrático es estadísticamente significativo a 90% de confianza y puede ser utilizado para fines predictivos en el rango estudiado.

3.4.3 Ensayos adicionales

Dado que el diseño anterior no permite ubicar un rango óptimo dentro del análisis, sin embargo dado que el rango estudiado puede ser utilizado para fines predictivos, se hizo necesario realizar nuevas pruebas en donde se estudiara nuevas combinaciones de las variables del proceso, con el fin de

hallar la mejor combinación de estas. Los resultados obtenidos son reportados en la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones y resultados %ART para ensayos adicionales

[%V/V] Metanol	[M] H2SO4	[min] Tiempo	%ART
0	0.6	247	9.54
0	0.6	20	1.63
0	0.35	247	8.14
0	0.35	20	1.09
16.35	0.6	247	16.02
3.32	0.6	247	17.35
16.35	0.35	247	13.48
3.32	0.35	247	14.83
16.35	0.6	20	3.03
3.32	0.6	20	2.76
16.35	0.35	20	2.13
3.32	0.35	20	0.61

De los resultados anteriores se puede deducir que:

Con respecto a la concentración de metanol, se obtienen mejores resultados con la adición de este en la experimentación, aunque en muy bajos porcentajes, ya que las concentraciones altas del solvente no favorecen el pretratamiento.

El aumento en el tiempo de cocción, beneficia altamente el pretratamiento, independientemente de los valores de las demás variables estudiadas. Esta tendencia se observa también para la concentración de ácido en el licor, aunque su aumento no representa diferencias significativas como en el caso de la variable tiempo.

Se concluye con el análisis anterior, que las mejores condiciones de pretratamiento encontradas fueron: concentración de metanol en el licor 3.32 [%v/v], concentración de ácido 0.6 [M] y un tiempo de cocción de 247[*min*], para un porcentaje en peso de ART obtenido de la biomasa seca de *Ch gracilis* de 17% correspondiendo a un rendimiento del 100%. Este rendimiento pudo ser comprobado por la hidrólisis realizada al residuo obtenido durante este pretratamiento, donde se encontró 0% azúcares en la etapa de hidrólisis.

Se deduce de estos resultados que a estas condiciones, la pared celular de la diatomea es lo suficientemente desordenada para una buena extracción de Azúcares Reductores de la biomasa con el pretratamiento aplicado.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló por primera vez un método de pretratamiento metanol-ácido de la microalga *Ch gracilis* para la obtención de azúcares reductores totales.
- Del estudio del pretratamiento metanol-ácido, se deduce que es un pretratamiento lo suficientemente eficiente que permite la obtención de todos los azúcares reductores presentes en la biomasa de la microalga *Ch gracilis*.
- Las condiciones del pretratamiento metanol-ácido a las cuales se obtuvo mejores resultados de extracción de ART en el proceso fueron de 3,32 [%v/v] de metanol en el licor, 0.6 [M] de ácido y un tiempo de cocción de 247[min], para un porcentaje en peso de ART obtenido de la biomasa seca (microalga *Ch gracillis*) de 17%, alcanzandose rendimientos de ART hasta de un 100%.
- A pesar de no presentar significancia la concentración de metanol en el análisis estadístico, se observó la necesidad de utilizar pequeñas concentraciones de metanol para obtener un proceso con altos rendimientos de ART.
- El modelo cuadrático obtenido con el diseño experimental mostró ser estadísticamente significativo a 90% de confianza, representando así los datos obtenidos para el proceso de pretratamiento con metanol-acido a la microalga *Ch gracillis*

BIBLIOGRAFÍA

1. Flores P, Luz y López V, José. Las microalgas, fuente de aceite para la producción de Biodiesel.
2. Chum H. L., Douglas L.J., Feinberg D. A. evaluación de tratamientos previos de biomasa para hidrólisis enzimática de celulosa.
3. Marshall, D.W. (1987). *Biología de las algas. Enfoque fisiológico*. Ed. Limusa. México, D.F. Pag 12-13.
4. Voltolina, d., Trujilla, V. y González L.M.I. (1991). La colección de cepas de microalgas del departamento de acuicultura de C.I.C.E.S.E. Comunicación Académica. Serie acuicultura CTACT-9101, C.I.C.E.S.E. Ensenada, Baja California, México.
5. Ben-Amotz, A., Fishler, R. y Schneller. (1987). Chemical Composition of Dietary species of Marine Unicellular algae and Rotifers with Emphasis on fatty acids. *Marine Biology*. 99:31-36
6. Fabregas, J. y Abalde, J. (1989). Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* by nitrogen concentration as nitrate, nitrite and urea. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago, España. Paga 223-239.
7. Whyte, N.C.J. y Nagata W.D. (1990). Carbohydrate and Fatty Acid composition of the Rotifer, *Brachionus plicatilis*, Feed Monospecific Diets of Yeast or Phytoplacton. *Aquaculture*. Elsevier Science Publishers.
8. Myklestad, S y Haug, A. (1972). Production of Carbohydrates by the Marine Diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (gran) Hustedt. Y. Effect of the Concentration of Nutrientes in the Culture Medium
9. Mallo, J.C., Fenucci, J.L., (2004). Alimentación de protozoos del langostino *pleoticus muelleri* utilizando diferentes microencapsulados y especies de microalgas. *Revista De biología marina y oceanografía*, volumen 39, número 001, 14.

10. Sukenik, A., Zmora, D. y Carmeli, Y. (1993). Biochemical Quality of Marine Unicellular Algae with Special Emphasis on Lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*, 117:313-326. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
11. Cambefort F, Santiago. Arcos, Frenando. Efecto de las microalgas *Chaetoceros gracilis*, *tetraselmis* sp. e *Isochysis galbana* sobre la reproducción y desarrollo naupilar en copépodos Calanoideos Marinos Tropicales, *Acartis spp.*
12. HAUG, A y MYKLESTAD, S. Polysaccharides of Marine Diatoms with Special Reference to *Chaetoceros* Species. *Marine Biology* 34, 217-222. (1976).
13. Guarnizo, Anderson,. Martínez, Pedro., Valencia, Hoover,. Pretratamiento de la celulosa y biomasa para sacarificación. *Scientia et Technica* Año XV, No 42, Agosto de 2009. Universidad Tecnológica de Pereira. 284-286.
14. Montoya Castaño, Dolly. QFUN M. Sc. Ph. D. La importancia de los subproductos agrícolas en la producción de los biocombustibles. Estudio de casos del IBUN. Instituto de biotecnología. Universidad Nacional de Colombia.
15. SARKANEN, K. Chemistry of solvent pulping. University of Washington, Seattle, wash. *Tappi Journal*, Octubre 1990.
16. MORALES, Yolanda y SANCHEZ, Ilsen. Diseño Conceptual y comparación técnica de los procesos de hidrólisis ácida y enzimática para la producción de glucosa a partir de almidón de yuca. UIS 2004.
17. Freifelder, David (1987). *Molecular Biology*, 2nd edition. Boston: Jones and Bartlett. Hydrolysis - Chemistry Encyclopedia - structure, reaction, water, proteins, examples, salt, molecule. <http://www.chemistryexplained.com/HyKr/Hydrolysis.html#ixzz0d79yuugG>
18. BEMILLER, James. Acid Hydrolysis and other Lytic Reactions of Starch: Chemistry and Technology. Academic Press. 1965, Vol. I, pp 495-519.

19. TENA, Manuel y JORRÍN, J. Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular . Campus Universitario Rabanales.
20. (Guillard y Ryther 1962, Guillard 1975)
21. GARZÓN FUENTES, Laura. “Optimización del pretratamiento con peróxido de Hidrógeno alcalino del bagazo de caña de azúcar para la producción de glucosa”. Tesis de pregrado. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander.

ANEXOS

ANEXO A. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES EN BIOMASA PROCEDIMIENTO ANALÍTICO EN EL LABORATORIO (LAP-NREL)

NREL/TP-510-42621

Las muestras de biomasa pueden contener humedad en cantidades grandes y variantes, las cuales pueden cambiar rápidamente cuando son expuestas al aire. Para ser válidos, los resultados de análisis químicos son comúnmente reportados en pesos sobre base seca. El procedimiento utilizado se basó en la norma NREL/TP-510-42621 y se presenta aquí un resumen del procedimiento.

1. Se pesaron y posteriormente se secaron los recipientes contenedores vacíos en un horno secador a 105°C durante por lo menos 4 horas. Se pesó y registró el peso seco de los contenedores con 0,1g de exactitud.
2. Se pesaron cerca de 2g de muestra dentro del contenedor y se registró este peso.
3. Se lleva la muestra al horno a 105°C por mínimo 4 horas, se retira y se deja enfriar en un desecador. Se pesa el desecador con la muestra y se registran los valores
4. Se introduce la muestra de nuevo en el horno a 105°C y se seca hasta peso constante. El peso constante es definido como un cambio de \pm 0.1% en el porcentaje de sólidos después de una hora de recalentamiento de la muestra.
5. Cálculos

El porcentaje de humedad se puede calcular:

$$\% \text{Humedad} = 100 - \left(\frac{(W_{\text{contenedor} + \text{muestra seca}} - W_{\text{contenedor seco}})}{W_{\text{muestra inicial}}} \times 100 \right)$$

ANEXO B. MÉTODO DEL ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)

El método del ácido dinitro-3,5 salicílico descrito por Miller (1959), se basa en la reducción del ácido dinitro-3,5 salicílico a ácido 3-amino-5 nitro salicílico al mismo tiempo en el que el grupo aldehído del azúcar es oxidado al grupo carboxílico (Miller 1959) con el desenvolvimiento de la coloración rojiza leída espectrofotométricamente a 540nm.

·PASOS PARA PREPARAR DNS.

- Disolver 1.6g de NaOH en H₂O destilada.
- Adicionar 30g de tartrato de Na y K
- Adicionar 1g de DNS
- Aforar a 100ml con H₂O destilada.
- Almacenar en frascos ámbar a 4^oc.

Se debe mantener un stock de glucosa (patrón) 4mg/ml y almacenarlo a 4^oc.

A partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/l) : 0.25-0.5-1-2 y 4.

Procedimiento:

- Tomar 0.5ml de cada solución y agregar 0.5ml de reactivo DNS.
- Preparar una muestra blanco por dilución de 0.5ml de H₂O destilada a 0.5ml del reactivo DNS.
- Agitar todas las muestras.
- Colocar a ebulir las muestras en baño de maría por 5 minutos.
- Enfriar con hielo.
- Adicionar 5ml de H₂O destilada.
- Agitar y dejar en reposo 15min.
- Leer a 540nm.
- Realizar la curva de absorbancia versus concentración. Debe tener un coeficiente de correlación de 0.991 a 0.999.

La curva de calibración obtenida para esta investigación y con las que se hicieron todas las conversiones respectivas de datos de absorbancia a concentraciones de glucosa fue la siguiente:

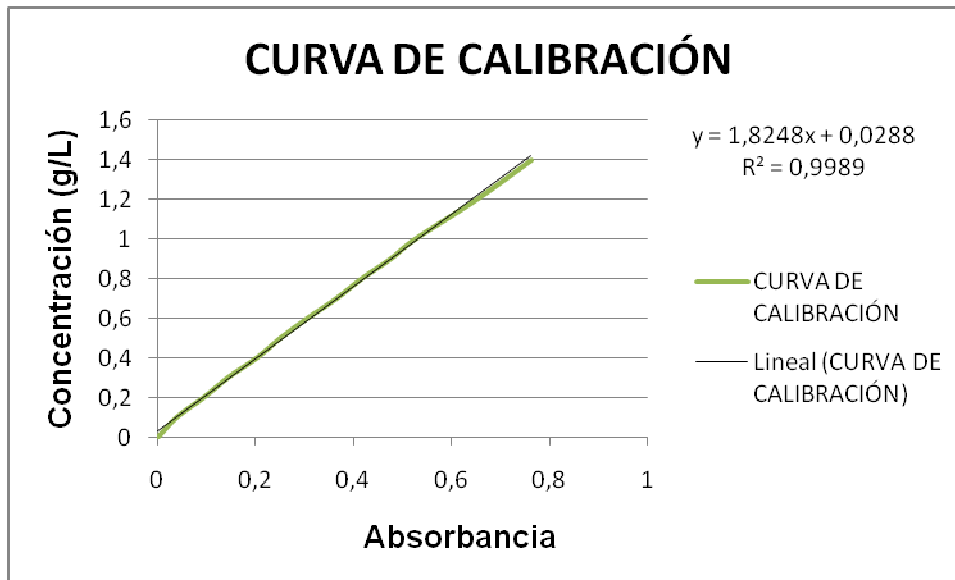


Figura B1.Curva de calibración DNS

Normativa:

- La curva de calibración deber ser comparable con la validada por el laboratorio, lo contrario se debe repetir el ensayo corrigiendo las posibles fallas cometidas. (Verificar que el DNS este en buen estado y que el stock de glucosa no esté vencido o fermentado)
- La ley de Beer-Lambert solo es aplicable a bajas concentraciones al elaborar la curva de calibración para garantizar la linealidad, por lo tanto las muestras deben ser diluidas adecuadamente para poder leerlas dentro de la curva sin necesidad de extrapolar. Los rangos de linealidad de las curvas de absorvancia vs concentración para el caso de la glucosa está entre 0.0-1.2 g/l.
- Se debe hacer una curva de calibración cada vez que se haga un ensayo.

- Tanto la curva de calibración como las muestras se deben hacer por duplicado.
- Para muestras con altas concentraciones de azúcares reductores no es consistente la relación lineal entre absorbancia y concentración, por lo tanto las muestras deben ser diluidas según el contenido de azúcares; algunas diluciones pueden ser al 5%, 10% y 20%.

ANEXO C. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES DESPUÉS DE LA ETAPA DE PRETRATAMIENTO

La hidrólisis en este estudio se realizó con base en la norma LAP007 (NREL/TP-510-42618), de la siguiente forma:

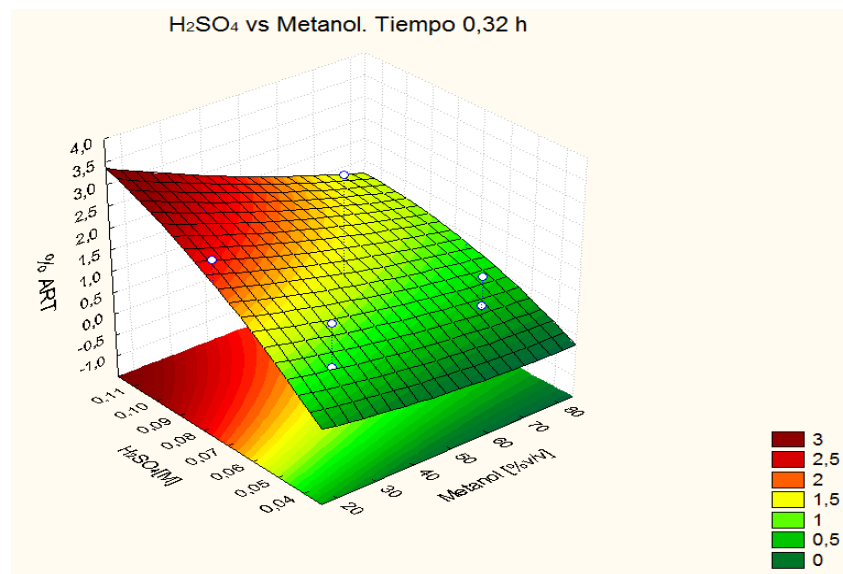
Se pesó 1 g de biomasa y se mezcló en un tubo de ensayo con 10 mL de H₂SO₄ al 72% en volumen. Esta mezcla se mantuvo durante una hora en un baño con agua a 30°C y agitación cada 10 min.

Posteriormente en un erlenmeyer se agregó la mezcla anterior con 280mL de agua destilada y se sometió a Autoclavado durante una hora a 121°C. Pasada la hora se separó la biomasa del licor por filtración al vacío. Al licor se le hizo un análisis con DNS para la cuantificación de ART en este, y la biomasa se lavó y secó a 105°C durante 12 horas.

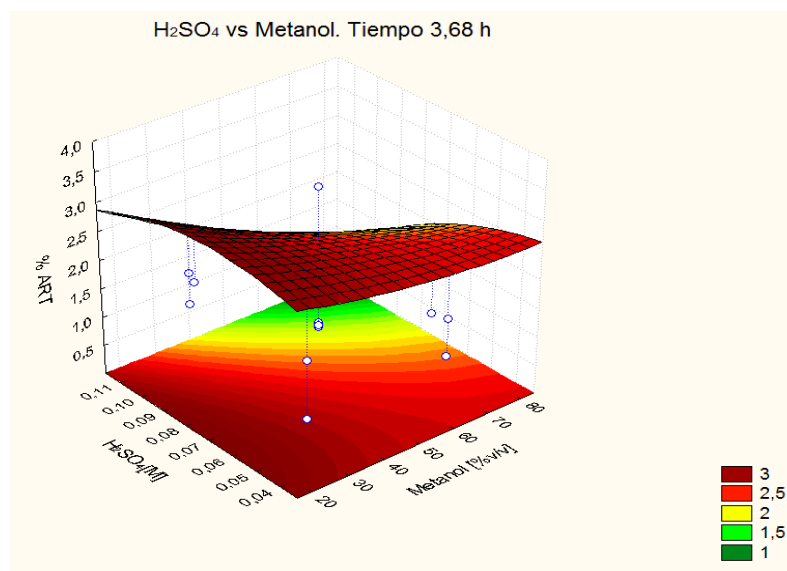
ANEXO D. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS VARIABLES DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS No.1

A continuación se presentan las superficies de respuesta para cada análisis hecho anteriormente, manteniendo cada variable en su valor máximo y mínimo del primer diseño de experimentos.

Interacción Metanol-Ácido



(a)

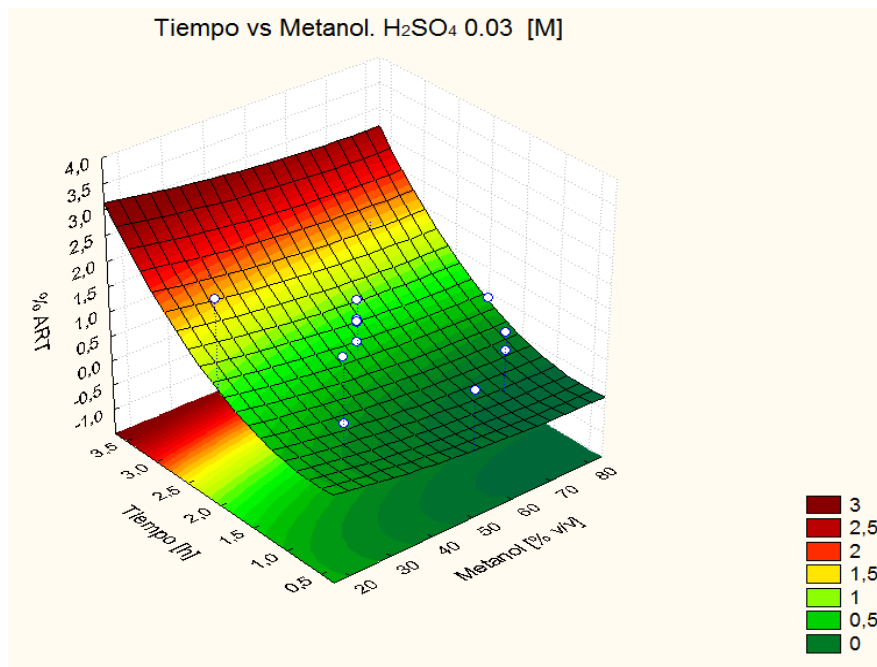


(b)

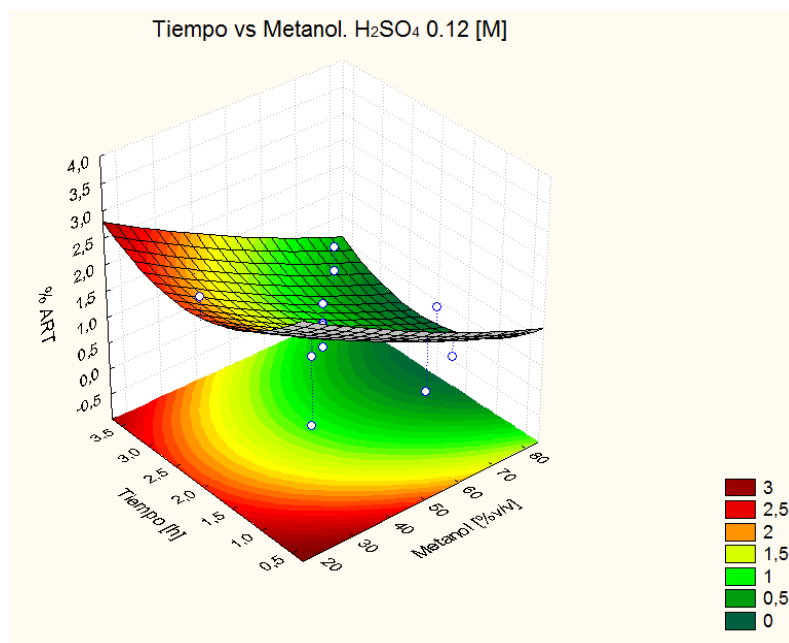
Figura D1. Superficie de respuesta H₂SO₄ vs Metanol. (a) Tiempo 0.32h. (b) Tiempo 3.68h

La figura D1 muestra el efecto de la interacción entre las variables metanol y ácido, manteniendo el tiempo en el punto mínimo (a) y máximo (b) del diseño. De acuerdo con la figura D1 (a), los rendimientos máximos de ART obtenidos (3 %ART) para este diseño se logran con la mayor concentración de ácido y menor concentración de metanol contemplados. Para la figura D1 (b), la tendencia de los resultados con respecto al metanol se mantiene de la misma forma, aunque la de las concentraciones de ácido cambia, encontrándose los mejores resultados a menores concentraciones de ácido.

Interacción Metanol-Tiempo



(a)



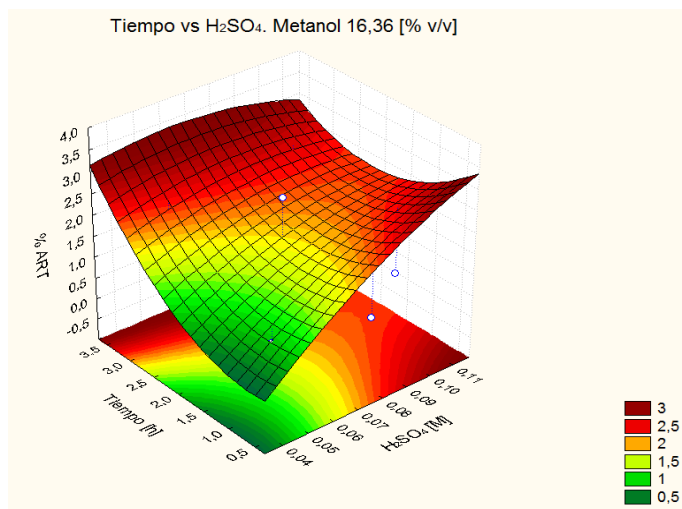
(b)

Figura D2. Superficie de respuesta tiempo vs metanol. (a) H_2SO_4 0.03 [M]. (b) H_2SO_4 0.12 [M].

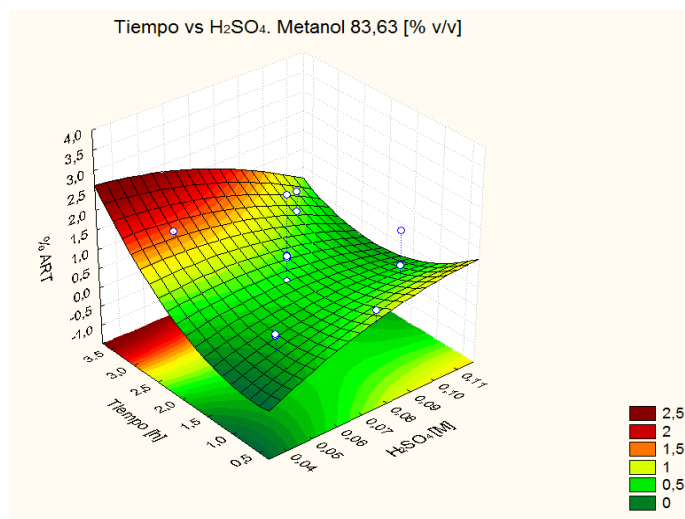
La figura D2 muestra el efecto de la interacción entre las variables metanol y tiempo, manteniendo la concentración de ácido en el punto mínimo (a) y máximo (b) del diseño. Se observa que la concentración de ART máxima para ambos análisis puede llegar a ser hasta de un 3% de ART.

Para la figura D2 (a) el máximo rendimiento se encuentra en el extremo superior del intervalo estudiado de tiempo y a menores concentraciones de metanol en el licor. Para la figura D2 (b) se encuentra el mayor rendimiento en el extremo inferior izquierdo de la gráfica (menores concentraciones de metanol y menor tiempo), sin embargo se ve una tendencia a obtener buenos rendimientos a medida en que también se aumenta el tiempo de cocción.

Interacción Ácido-Tiempo



(a)



(b)

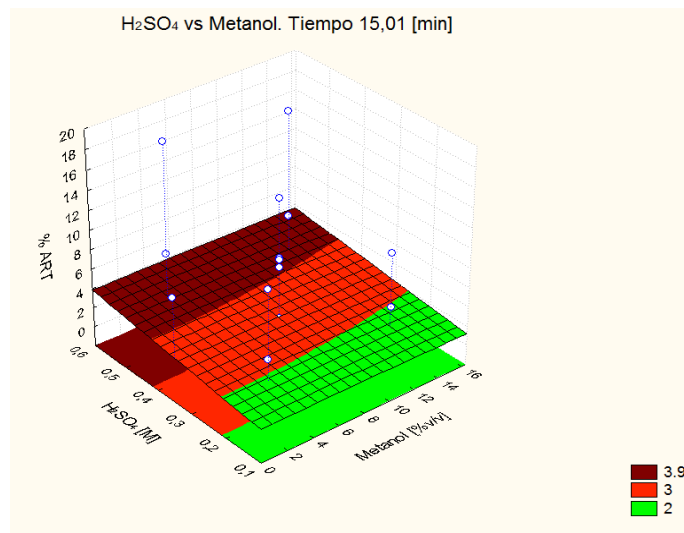
Figura D3. Superficie de respuesta tiempo vs H₂SO₄. (a) Concentración de metanol 16.36 [%v/v]. (b) Concentración de metanol 83.63 [%v/v].

La figura D3 muestra el efecto de la interacción entre las variables tiempo y ácido manteniendo la concentración de metanol en el punto mínimo (a) y máximo del diseño (b). La figura D3 (a) alcanza rendimientos hasta de 3% ART y la figura D3 (b) hasta de 2.5% ART, sin embargo sus tendencias son las mismas, los mejores rendimientos de ART resultan a mayores tiempos y menores concentraciones de ácido.

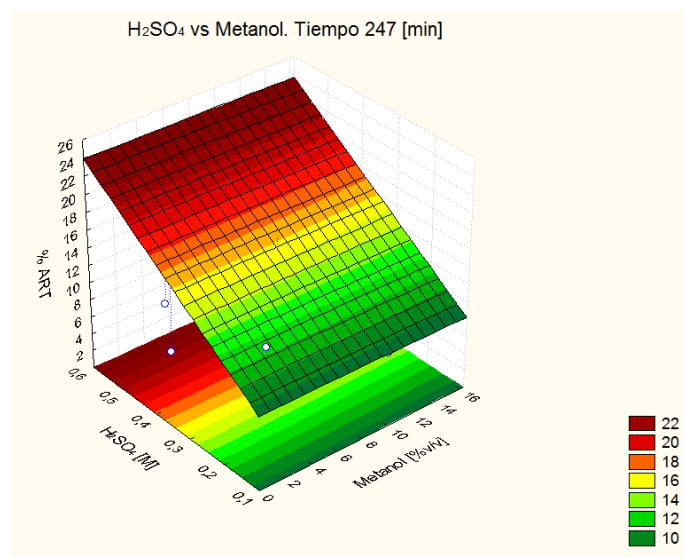
ANEXO E. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS VARIABLES DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS No.2

A continuación se presentan las superficies de respuesta para cada análisis hecho anteriormente, manteniendo cada variable en su valor máximo y mínimo del primer diseño de experimentos.

Interacción Metanol-Ácido



(a)

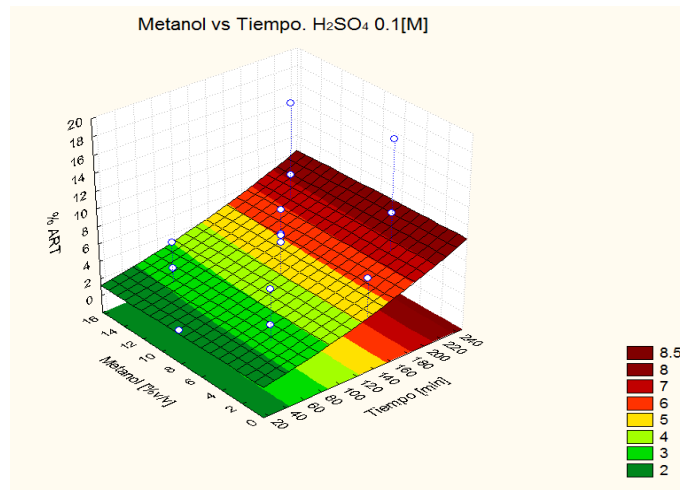


(b)

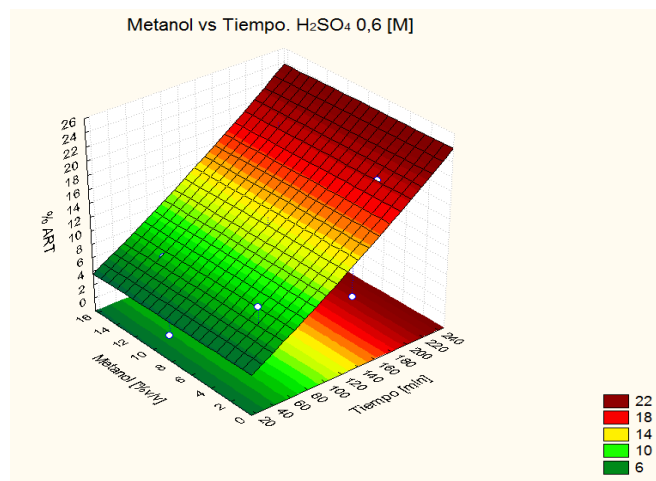
Figura E1. Superficie de respuesta H₂SO₄ vs Metanol. (a) Tiempo 15.01 [min]
(b) Tiempo 247 [min]

La figura E1 muestra el efecto de la interacción entre las variables metanol y ácido, manteniendo el tiempo en los puntos mínimo (a) y máximo (b) del diseño. De acuerdo con esta figura, se pueden alcanzar rendimientos hasta de un 3,9% y un 22% de ART respectivamente, y ambas siguen la misma tendencia (mejores resultados al aumentar la concentración de ácido y la concentración de metanol en el licor es indiferente). Se puede deducir de las gráficas anteriores que el aumento del tiempo favorece la obtención de ART.

Interacción Metanol-Tiempo



(a)

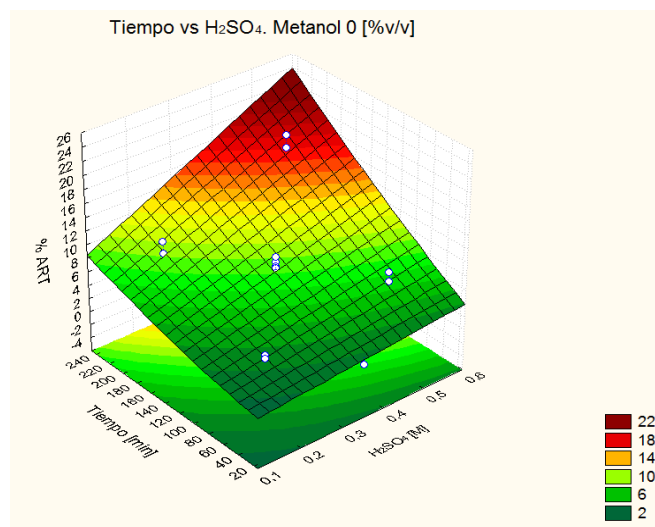


(b)

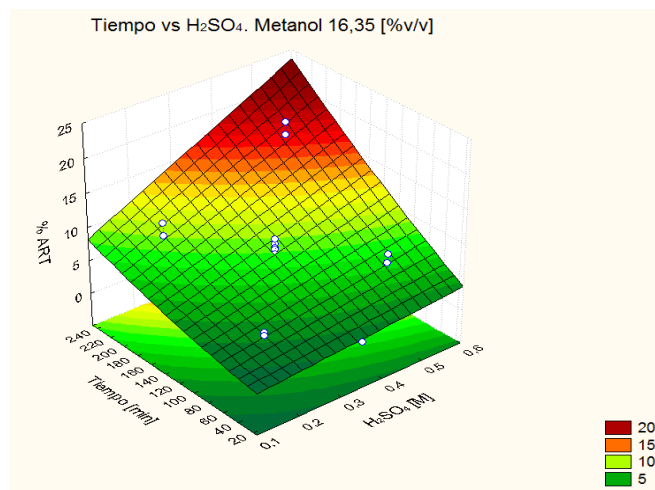
Figura E2. Superficie de respuesta Tiempo vs metanol. (a) Concentración de H_2SO_4 0.1 [M]. (b) Concentración de H_2SO_4 0.6 [M].

La figura E2 muestra el efecto de la interacción entre las variables metanol y tiempo, manteniendo la concentración de ácido en sus puntos mínimo (a) y máximo (b) del diseño. Se muestran mayores rendimientos de ART a mayores concentraciones de ácido (22% de ART) con respecto a menores concentraciones (8.5% de ART). Además la tendencia es aumentar el tiempo para una mejora en los resultados.

Interacción Ácido-Tiempo



(a)



(b)

Figura E3. Superficie de respuesta tiempo vs H₂SO₄. Concentración de Metanol 8.18%v/v.

La figura E3 muestra el efecto de la interacción entre las variables tiempo y ácido manteniendo la concentración de metanol en los puntos mínimo (a) y máximo (b) del diseño. Se muestra en ambas figuras que los porcentajes de ART obtenidos aumentan al aumentar el tiempo de cocción y la concentración de ácido en el licor.

ANEXO F. CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

La caracterización de la biomasa fue realizada por El Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) con la cooperación de la universidad de Antioquia y se reportaron los siguientes resultados para la microalga *Ch gracilis*.

Tabla F1: Análisis sobre las muestras de *Chaetoceros gracilis* (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de FeCl_3 , por El Instituto Colombiano de Petróleo (ICP)

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

Tabla F2: Análisis sobre las muestras de *Chaetoceros gracilis* (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de FeCl_3 , por La Universidad de Antioquia (UDEA)

Análisis	Resultado
%Humedad	11,53
%Cenizas	61,74
%Carbohidratos	17,27
%Proteína	9,39
%Nitrógeno	1,502

%Grasa	0,061
%Calorías	107,2
%Fibra bruta	0,18

Tabla F3: Análisis efectuados sobre las muestras de *Ch gracilis* (diez días de cultivo) floculada con 150 ppm de FeCl₃, en el laboratorio

Análisis	Resultado
%Humedad	14,85
%Cenizas	44,92
% Lípidos	1.23
% carbohidratos	3,774176

ANEXO G. EFECTO DEL FLOCULANTE SOBRE LA MEDICIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Tabla G1. Efecto del floculante sobre la medición de ART

CONCENTRACIÓN g Glucosa/L Sin	AUTOCLAVE									
	0,5 ml Floculante	0,45 ml Floculante	0,4 ml Floculante	0,3 ml Floculante	0,3 ml Floculante	0,2 ml Floculante	0,1 ml Floculante	sinFloculante		
50 FeCl₃	0,025874	0,077606	0,189692	0,357821	0,567623	0,686894	0,788921	0,865082		
200 Al₂(SO₄)₃	0,027311	0,08048	0,185381	0,363569	0,875141	0,71276	0,791795	0,911066		
150 FeCl₃	0,047429	0,096287	0,183944	0,347762	0,523076	0,688331	0,758744	0,72713		
300 FeCl₃	0,061799	0,127901	0,196877	0,342014	0,505832	0,679709	0,742937	0,804728		