

**APROVECHAMIENTO DE BIOMASA DE LA MICROALGA *Amphiprora* sp.  
PARA LA OBTENCIÓN DE PIGMENTOS, FICOBILIPROTEÍNAS Y LÍPIDOS  
BAJO EL CONCEPTO DE BIOREFINERÍA**

**ERIKA LILIANA AMAYA TOLEDO  
LINA MARCELA GARCÍA PEÑALOZA**

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

**2012**

**APROVECHAMIENTO DE BIOMASA DE LA MICROALGA *Amphiprora* sp.  
PARA LA OBTENCIÓN DE PIGMENTOS, FICOBILIPROTEÍNAS Y LÍPIDOS  
BAJO EL CONCEPTO DE BIOREFINERÍA**

**ERIKA LILIANA AMAYA TOLEDO  
LINA MARCELA GARCÍA PEÑALOZA**

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

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

**Codirector  
ÁNGEL DARIO GONZÁLEZ DELGADO  
Ingeniero Químico**

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

**2012**

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a:

XXVI CONGRESO COLOMBIANO DE INGENIERÍA QUÍMICA, “Energía y Desarrollo Sostenible”, por aceptar avances de este trabajo para su presentación como ponencia oral.

SEMINARIO INTERNACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE, “Ciencia y Tecnología para la Supervivencia”, por incluir los avances de este trabajo como ponencia oral.

V CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS BIOCOMBUSTIBLES, CIBSCOL 2012, por aceptar los resultados de este trabajo como ponencia oral.

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

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

INGENIERO ÁNGEL DARÍO GONZÁLEZ DELGADO, por todos sus valiosos aportes y constante apoyo.

BIÓLOGO ANDRÉS BARAJAS por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO técnicos del laboratorio de procesos de Ingeniería Química, por su ayuda, enseñanzas y orientación durante la ejecución durante las pruebas experimentales.

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

## DEDICATORIA

*A Dios, por guiarme siempre en cada etapa de mi vida y permitirme cada día ser mejor persona.*

*A mis padres Abel y Esperanza a quienes dedico especialmente este gran logro porque con su amor, ternura, esfuerzo y dedicación me brindaron siempre su apoyo durante mi formación personal y profesional. Mi triunfo es el de ustedes, los amo infinitamente.*

*A mi hermano Luis Guillermo quien siempre ha estado orgulloso de mí como yo de él y a quien agradezco su apoyo y amor los cuales me impulsaron a conseguir este logro.*

*A mis tíos Jaime y Elizabeth por ser mis segundos padres, por estar pendientes de mí y por sus buenos consejos. A mis primitos, por siempre estar ahí cuando los necesito.*

*A Jesús Miranda, quien me brindó su amor, su cariño, su estímulo y apoyo constante.*

*A Lina Marcela García (monita), por su gran paciencia, por su linda amistad durante toda la carrera y por permitirme compartir junto a ella la realización de este proyecto.*

*A mis compañeros y amigos de toda la carrera Pili, Lore, Dayis, Rao, La Alaca, La Chiquis, Jhon, Omar, Andrés, Eduar y Victor a quienes doy infinitas gracias porque desde el socorro siempre nos hemos mantenido juntos y hemos estado apoyándonos los unos a los otros. Gracias por hacer parte de esta gran aventura de mi vida "La Universidad".*

*A mis más recientes amigos Johana, Lore, Moni, Angie, Santi, Migue, Andrés, Natha, Diana, Moncho y chely quienes doy gracias por permitirme ser parte de sus vidas, por su amistad incondicional, por el gran apoyo que me han brindado y porque hicieron de mi paso por la universidad algo inolvidable.*

*Erika Amaya Toledo*

## DEDICATORIA

*Este gran triunfo en mi carrera, es gracias a los esfuerzos realizados a todas aquellas personas que siempre estuvieron a mi lado apoyándome y guiándome para poder alcanzarlo, es por esto que quiero agradecer primero a Dios por que sin el no estaría culminando uno de los proyectos de mi vida.*

*A mis papitos, por darme la gran oportunidad de crecer como profesional, por el apoyo incondicional durante toda mi vida y por acompañarme en este gran camino que he culminado, los quiero mucho, y este logro también es de ustedes.*

*A mi hermanito, por estar presente en cada paso dado, por sus consejos, su cariño, su mal genio, porque todo lo que me regalas cada día me hace mejor persona y aprender a quererte mucho más. Gracias a ti los ensayos y la presentación salieron excelentes, te quiero mucho mi niño.*

*A la señorita Pilar por acompañarme en cada momento aunque este lejos, por sus consejos, y sobretodo por aguantar mis malos genios, eres una excelente amiga te quiero mucho.*

*A todos mis amigos tanto los que están lejos, dayis, lore, paola, flak, pili, la chiquis, pero que han estado pendientes de este logro; y los que se encuentran cerca, Johanna, Nanita, Angie, John, Eduar, Rolita, Andrés, Migue, Omar, Victor y Tarazone por acompañarnos en la elaboración de este trabajo, por su ayuda al ensayar tan esperada presentación, por colaborarnos tanto, gracias chinitos, los quiero muchos a todos.*

*A mi compañera de tesis, Kiñis, por ser parte de este gran triunfo por su apoyo y compañía, porque a pesar de que en ocasiones me estresabas, sé que todo sirvió para que pudiéramos alcanzar esta meta, se le quiere mucho mamita!!! Y éxitos en esta nueva etapa Ingeniera.*

*No podría terminar estos agradecimientos sin citar a una personita que es muy importante para mí, mi bebe, Odín; porque quizás muchos no entiendan la conexión que existe entre un apersona y un perrito, yo que tengo el privilegio te doy gracias porque siempre estar ahí para escucharme sin juzgarme y para hacer las caras que tu sola sabes hacer y así subirme el ánimo. Eres mi gran confidente, amigo e hijito. TQM.*

*Por último gracias a todas aquellas personas que hicieron parte de este proyecto, a los ingenieros que nos brindaron sus conocimientos, al grupo de investigación de Biomasa, por hacernos parte de esta gran familia.*

Lina García

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.....	20
2.1. Elección de la Mezcla de Solventes.....	21
2.2. Estudio de Variables que Afectan la Extracción de Pigmentos y Lípidos.....	22
2.3. Extracción y Cuantificación de Pigmentos.....	22
2.4. Extracción de Lípidos.....	24
2.5. Análisis Estadístico.....	25
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	25
3.1. Elección de la Mezcla de Solventes.....	25
3.2. Estudio de Variables que Afectan la Extracción de Pigmentos y Lípidos.....	28
3.3. Análisis Estadístico.....	29
3.3.1. Extracción de Clorofilas y Ficobiliproteínas.....	29
3.3.2. Extracción de Lípidos.....	34
CONCLUSIONES.....	37
RECOMENDACIONES.....	38
REFERENCIAS.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXOS.....	44

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Propiedades principales de los pigmentos y ficobiliproteínas. ....	17
Tabla 2. Reporte de literatura especializada.....	19
Tabla 3. Valores y Niveles de las Variables estudiadas.....	22
Tabla 4. Resultados de los diferentes pigmentos y lípidos extraídos.....	28

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Pirámide de valorización de biomasa de microalgas. ....	18
Figura 2. Metodología Experimental. ....	20
Figura 3. Metodología de Extracción de Lípidos. ....	24
Figura 4. Efecto del solvente polar sobre la concentración de Chl-a y Chl-b....	26
Figura 5. Efecto del Solvente polar sobre la concentración de PC y APC. ....	26
Figura 6. Efecto del solvente apolar sobre la eficiencia del extracto lipídico. ...	27
Figura 7. Diagramas de Pareto y de Superficie de Respuesta, para analizar el efecto de las variables estudiadas sobre la extracción de Chl-a. ....	30
Figura 8. Diagramas de Pareto y de Superficie de Respuesta, para analizar el efecto de las variables estudiadas sobre la extracción de Chl-b. ....	31
Figura 9. Diagramas de Pareto y de Superficie de Respuesta, para analizar el efecto de las variables estudiadas sobre la extracción de PC. ....	32
Figura 10. Diagramas de Pareto y de Superficie de Respuesta, para analizar el efecto de las variables estudiadas sobre la extracción de APC.....	33
Figura 11. Diagramas de Pareto y de Superficie de Respuesta, para analizar el efecto de las variables estudiadas sobre la extracción de lípidos.....	35



## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo A. EXTRACCIÓN DE ACEITE CRUDO MEDIANTE EL MÉTODO SOXHLET .....	44

## RESUMEN

**TÍTULO:** APROVECHAMIENTO DE BIOMASA DE LA MICROALGA *Amphiprora* sp. PARA LA OBTENCIÓN DE PIGMENTOS, FICOBILIPROTEÍNAS Y LÍPIDOS BAJO EL CONCEPTO DE BIOREFINERÍA \*

**AUTORES:** ERIKA LILIANA AMAYA TOLEDO, LINA MARCELA GARCÍA PEÑALOZA \*\*

**PALABRAS CLAVES:** microalgas, pigmentos, ficobiliproteínas, lípidos, extracción.

Actualmente se está investigando el potencial de las microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles, sin embargo éstas también contienen productos de alto valor agregado como pigmentos, biliproteínas, entre otros, los cuales muchas veces son desaprovechados debido a que se retiran de las microalgas junto con los extractos lipídicos influyendo negativamente en las características finales del biodiesel producido, por lo que es de gran importancia separar estos componentes para obtener mas productos y a su vez conseguir un extracto lipídico con menos cantidad de impurezas, abordando el concepto de biorefinería.

En este estudio, se evalúan las variables que afectan la obtención de pigmentos, ficobiliproteínas y lípidos para la producción de biodiesel utilizando biomasa seca de la microalga *Amphiprora* sp. Inicialmente se evaluaron distintos sistemas de solventes para la extracción de los productos de interés; posteriormente se ejecutó un diseño experimental para estudiar el efecto de las variables temperatura, tiempo y relación biomasa/solvente en el porcentaje de pigmentos, ficobiliproteínas y lípidos extraídos. Para la cuantificación de pigmentos y ficobiliproteínas se utilizó espectrometría UV-Visible y para la extracción de aceite crudo se utilizó el método Soxhlet, por último se realizó un análisis estadístico con el fin de identificar qué variables afectan significativamente la extracción de estos componentes microalgales.

Las mejores condiciones para la obtención de pigmentos, ficobiliproteínas y extracto lipídico se dan a una relación biomasa/solvente de 1/10 g/mL, temperatura de 45 °C y tiempo de 4 h, siendo la relación biomasa/solvente la variable mas influyente en los dos casos.

---

\* Proyecto de Grado

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

## ABSTRACT

**TITLE: UTILIZATION OF BIOMASS FROM MICROALGAE *Amphiprora* sp. FOR OBTAINING PIGMENTS, PHYCOBILIPROTEINS AND LIPIDS UNDER THE CONCEPT OF BIOREFINERY\***

**AUTHORS: ERIKA LILIANA AMAYA TOLEDO, LINA MARCELA GARCÍA PEÑALOZA\*\***

**KEYWORDS:** microalgae, pigments, phycobiliproteins, lipids, extraction.

Nowadays the potential of microalgae as feedstock of biofuel production is deeply researched; however, these microalgae also contain high-value products such as pigments, biliproteins, and others which are often put away, due to those products are removed from microalgae with lipid extracts. It produces a negative influence on the final characteristics of the biodiesel produced. Therefore, it is quite important that these components can be separated in order to obtain more value products directly that a lipid extract with fewer amounts of impurities is reached, addressing the concept of bio-refinery.

In this project the variables which affect the pigments, phycobiliproteins and lipids production in the biofuel manufacture were evaluated using dry biomass obtained from a microalga known as *Amphiprora* sp. Initially, different solvent systems for extraction of the products mentioned were evaluated. Subsequently, an experimental design to study the effect of temperature, time, and biomass/solvent ratio on the pigments, phycobiliproteins and lipids percentage was made. Afterwards, in order to get a quantification of pigments and phycobiliproteins, a UV-Visible spectrometry was carried out, then a Soxhlet method was used to extract crude oil. Finally, a statistical analyst to identify the variables which significantly affect the extraction of these microalgae components was performed.

The best conditions for obtaining pigments, phycobiliproteins and lipid extract was found at a biomass/solvent ratio of 1/10 g/mL, 45°C and at 4 hours, the biomass/solvent ratio was the most influential variable in both cases.

---

\* Graduation Project

\*\* Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Co-director: Eng. Ángel González.

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de combustibles fósiles como fuente de energía ha sido actualmente reconocido como insostenible, dado el agotamiento de recursos y el impacto ambiental que causan, es por ello que especialistas se han enfocado en otras fuentes de energía prometedoras como son los biocombustibles, entre ellos se resalta el biodiesel a partir de microalgas [1,2], dado que se ha demostrado que su biomasa puede proporcionar una amplia variedad de compuestos de interés biotecnológico, como los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga, proteínas, carbohidratos y pigmentos en grandes cantidades y en cortos períodos de tiempo.

Generalmente la biomasa de microalgas está constituida por 20-30% de lípidos, 40-50% de proteínas, y la parte restante subdividida entre los carbohidratos, que en algunas especies pueden llegar hasta el 55% de la biomasa y otras sustancias especiales propias de cada cepa de microalga [3].

Entre los componentes de las microalgas se encuentran diversos productos de alto valor agregado como las clorofilas que son esenciales en muchos productos de uso diario, además tiene una aplicación terapéutica en el tratamiento de la anemia y reducen la presión sanguínea alta e inflamaciones [4]. Dentro de las microalgas también se encuentran las ficobiliproteínas (PBs), que son los principales pigmentos accesorios de las algas rojas y de algunas cianobacterias. Las PBs se clasifican principalmente en tres grupos: ficocianinas (PC), aloficocianinas (APC) y ficoeritrinas (PE), en la Tabla 1 se muestran las principales propiedades y aplicaciones de las clorofilas y ficobiliproteínas.

**Tabla 1. Propiedades principales de los pigmentos y ficobiliproteínas.**

Productos	Propiedades
<b>Chl-a</b>	Pigmento de color verde, predomina en los vegetales y es el responsable de la fotosíntesis mediante la absorción de energía lumínica. Se utiliza no sólo como aditivo en productos farmacéuticos y cosméticos, sino también como agente colorante natural, desintoxica y oxigena nuestras células de forma muy efectiva, además es fuente de vitaminas y minerales, funciona como suplemento alimenticio y ayuda a eliminar los olores provocados por la transpiración, debido a que posee acción antioxidante. La composición química de la clorofila es similar a la composición de la sangre humana, excepto que el átomo central de la clorofila es el magnesio, mientras que el de la sangre es el hierro.
<b>Chl-b</b>	Presenta las mismas propiedades de la Chl-a pero siendo un pigmento accesorio presente en vegetales y otras células fotosintéticas complejas que transfiere la energía a la Chl-a.
<b>PC</b>	Las ficocianinas son ficobiliproteínas que se extraen de las algas verde-azules, se utilizan como colorantes naturales en la industria alimentaria y de cosméticos. También poseen propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y neuroprotectoras; es por esto que se pueden utilizar en enfermedades neurodegenerativas causadas por el estrés oxidativo (Alzheimer, Parkinson), así como para las úlceras gástricas y el cáncer de colon.
<b>APC</b>	Las aloficocianinas son ficobiliproteínas que se utilizan como indicadores en química fina molecular debido a sus propiedades fluorescentes y se utilizan comúnmente en equipos de inmunoensayo, también han mostrado poseer valor terapéutico debido a su actividad inmunomoduladora y anticarcinogénica.

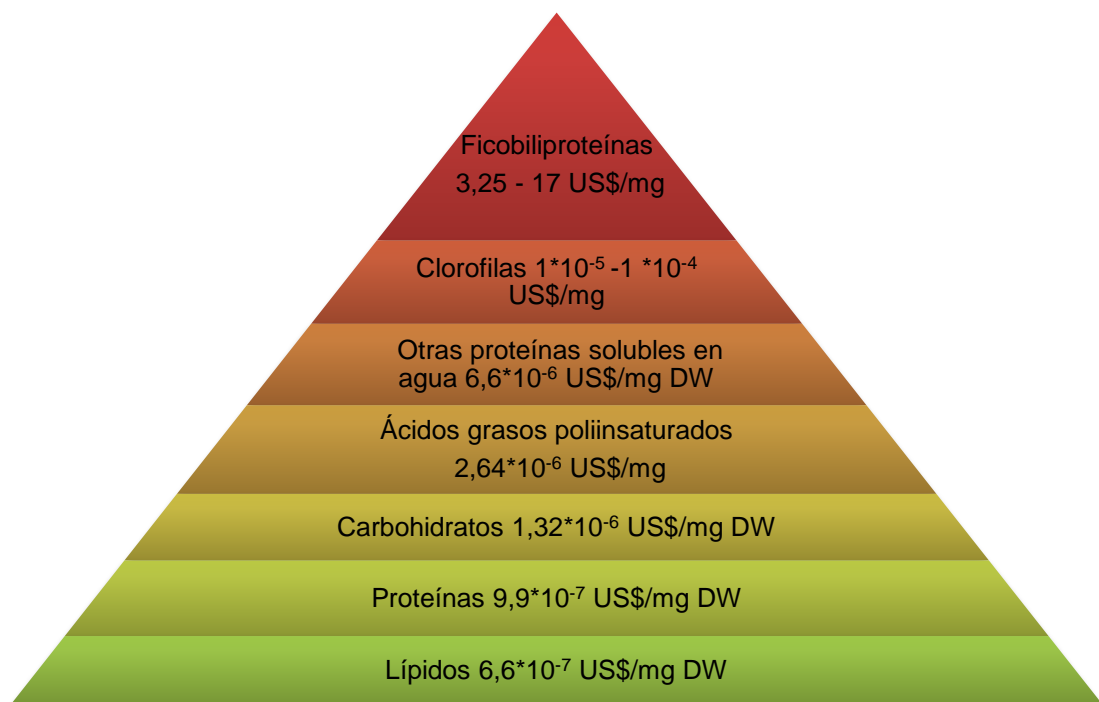
**Fuente:** Chl-a y Chl-b [4, 7, 9, 10, 11, 13] PC y APC [5, 6, 8, 12].

Sin embargo, estos componentes no son aprovechados en las cadenas de producción de biocombustibles a partir de microalgas, los cuales son objeto de estudio actualmente, debido a que los métodos utilizados en procesos de destrucción de pared celular y extracción de lípidos para la producción de biodiesel a escala laboratorio los extraen en mezcla con los productos de interés, afectando la pureza de los licores ricos en azúcares reductores y los triglicéridos utilizados en el proceso de transesterificación.

La biorefinería consiste en procesar biomasa de forma sostenible para obtener biocombustibles, productos comercializables y energía mediante procesos y equipos para la transformación de biomasa, por lo cual las microalgas se catalogan como candidatas promisorias en procesos de biorefinería debido a

su variada composición y potencial biotecnológico buscando un aprovechamiento total de su biomasa, obteniendo no sólo un extracto lipídico para la producción de biodiesel, sino también subproductos valiosos, los cuales, al tener un mayor valor comercial pueden contribuir a la viabilidad de la cadena de producción de biocombustibles a partir de microalgas. En la figura 1 se presenta la valorización de los productos obtenidos de la biomasa microalgal.

**Figura 1. Pirámide de valorización de biomasa de microalgas.**



**Fuentes: [6, 14, 15]**

En la actualidad no existe un método estandarizado para extraer productos de alto valor comercial como las clorofilas y las ficobiliproteínas utilizando como materia prima algas y microalgas, ya que varios autores han propuesto diversas condiciones de operación (tabla 2), por lo que se crea la necesidad de hacer un estudio para su extracción.

**Tabla 2. Reporte de literatura especializada.**

Ref	Materia Prima	Solvente de Extracción	Condiciones de Extracción de los metabolitos			
			Método de disrupción Celular	Relación Bio/Ste [g/mL]	T [°C]	t [min]
A	Algas	Acetona	Trituración	10 mL	4	120-1440
B	Algas	MetOH	Homogenización a 1000 rpm	1.0/ 50	28	1
C	Microalgas	Acetona	Molienda	10 mL	28	1
D	Microalgas	EtOH	Autoclave	0.3/2.0	121	30
E	Algas	EtOH	Calentamiento	No reporta	78	0,15
F	Microalgas	Acetona	Molienda	No reporta	28	3 a 6
G	Microalgas	EtOH	No reporta	1.0/1.0	4	No reporta
H	Algas	EtOH	Trituración y agitación a 500 rpm	3 mL	28	360
I	Microalgas	MetOH	Ultrasonido	No reporta	6	1440
J	Microalgas	Acetona	Molienda	No reporta	4	240

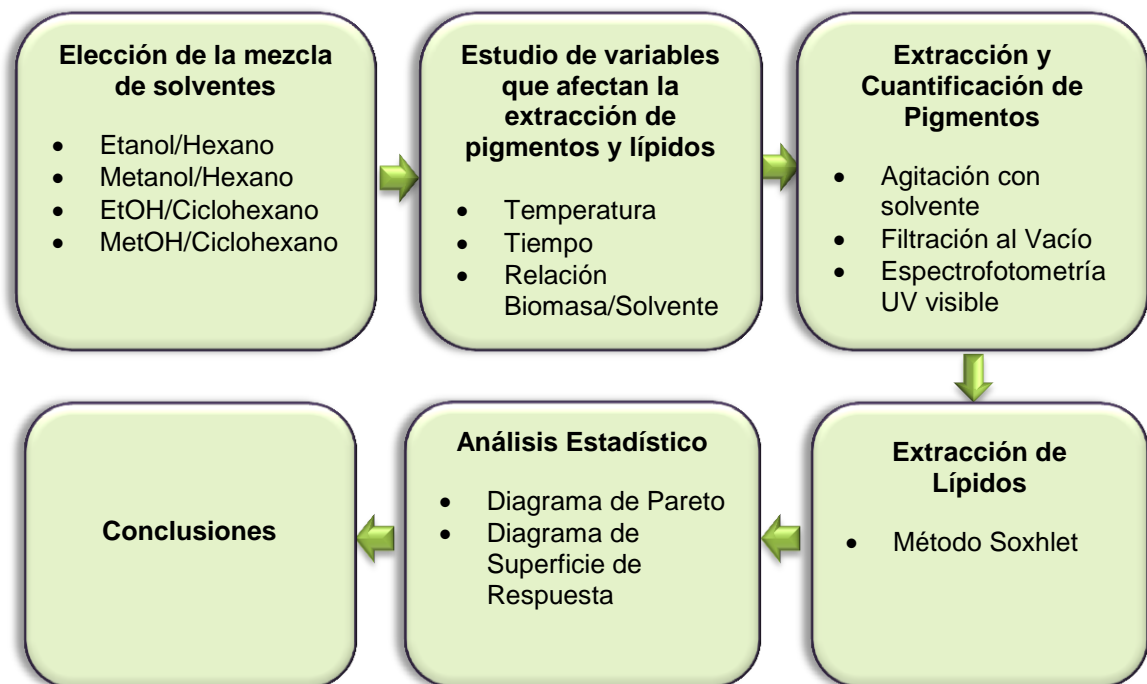
**Fuente: Autores**

De acuerdo a lo descrito anteriormente, el objetivo principal de esta investigación es estudiar las variables que afectan la obtención de clorofilas, ficobiliproteínas y lípidos en biomasa seca de la microalga *Amphiprora* sp. con miras al desarrollo de una topología de biorefinería para la obtención de biocombustibles, energía y co-productos de alto valor [16].

## 2. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

El desarrollo de la metodología experimental consta principalmente de la elección de una mezcla de solventes para la extracción tanto de pigmentos como de lípidos, seguida por un diseño experimental para minimizar el número de pruebas, posteriormente se realiza la etapa de extracción y cuantificación de clorofilas, ficobiliproteínas y lípidos, finalmente se realiza un análisis estadístico para los resultados obtenidos y se presentan las respectivas conclusiones; tal como se ilustra en la figura 2.

**Figura 2. Metodología Experimental.**



La microalga *Amphiprora* sp. utilizada para el desarrollo de este proyecto fue suministrada por la Corporación Instituto de Morrosquillo (punta Bolívar, Colombia), su cultivo se realizó en estanques abiertos utilizando un medio de cultivo F/2, se cosecharon por floculación con  $\text{FeCl}_3$  a 50 ppm, fueron secadas al sol y refrigeradas hasta su utilización.



## 2.1. Elección de la Mezcla de Solventes

Este procedimiento se llevó a cabo para la selección de la mejor mezcla de solventes para la extracción de clorofilas, ficobiliproteínas y lípidos en cuatro pruebas las cuales evaluaron dos tipos de solvente: polar (etanol, metanol) y apolar (hexano, ciclohexano); éstos fueron utilizados debido a que los solventes polares extraen lípidos desde la biomasa con algunos contaminantes celulares tales como azúcares, pigmentos, aminoácidos, sales y proteínas; con el solvente apolar se forma un sistema bifásico para la extracción del aceite crudo.

Para cada experimento, 3 g de biomasa seca fueron utilizados, primero se realizó una maceración con el fin de homogenizar la biomasa, seguidamente se agregó el solvente polar en una relación biomasa/solvente de 1:10 g/mL, luego la mezcla de biomasa-solvente fue sometida a agitación magnética a 350 rpm y temperatura ambiente durante 24 horas; seguidamente se realizó filtración al vacío a la mezcla donde se cuantificaron los pigmentos en la fase líquida. Para la separación de los lípidos, se agregó a la fase líquida un volumen de 6 mL de solvente apolar y 4 mL de agua destilada en la primera separación con el fin de obtener una separación de fases, las cuales se llevaron a un embudo de decantación y se extrajo la fase lipofílica, este proceso se repitió cuatro veces más con el fin de asegurar una efectiva separación del aceite de microalgas; una vez terminada la separación, se realizó un secado por volatilización con el fin de obtener el extracto lipídico y así realizar los respectivos cálculos para seleccionar la mejor mezcla de solventes tanto para cuantificación de pigmentos como para extracción de lípidos.

## 2.2. Estudio de Variables que Afectan la Extracción de Pigmentos y Lípidos

Una vez obtenida la mezcla de solventes para la extracción de pigmentos y extracto lipídico, se efectuó un diseño experimental central compuesto (DCC) para un intervalo de confianza del 95% en el software STATISTICA 7.0, con el fin de evaluar el efecto de las variables temperatura (35, 45 y 55°C), tiempo (2, 4 y 6 h) y relación biomasa/solvente (1/30, 1/60 y 1/90 g/mL) en la etapa de agitación sobre la extracción de clorofilas, ficobiliproteínas y aceite crudo; este diseño experimental también se realizó con el fin de disminuir el número de experimentos y el consumo de biomasa y solventes. Se realizó una réplica de cada combinación arrojada por el diseño experimental con el fin de reforzar los resultados, comparando datos obtenidos entre los diferentes niveles y datos de una misma combinación.

En la tabla 3, se muestran los valores y niveles de las variables estudiadas, arrojados por el software.

**Tabla 3. Valores y Niveles de las Variables estudiadas.**

FACTORES	NIVELES				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Relación Biomasa/Solvente [g/mL]	1/10	1/30	1/60	1/90	1/110
Temperatura [°C]	28,3	35,0	45,0	55,0	61,7
Tiempo [h]	0,65	2	4	6	7,35

## 2.3. Extracción y Cuantificación de Pigmentos

La cuantificación de pigmentos se realizó midiendo el espectro de absorción (absorbancia A) de los extractos de la fase hidroalcohólica después de la

filtración al vacío en un espectrofotómetro UV-visible (Spectroquant Pharo 300 Merck) a 665, 650 y 620 nanómetros (nm).

Posteriormente se aplicaron las ecuaciones 1-4 [17] para calcular las concentraciones de los diferentes pigmentos en microalgas; donde Chl-a es la concentración de clorofila a, Chl-b es la concentración de clorofila b, PC es la concentración de ficocianina y APC es la concentración de aloficocianina en mg/L. Estas ecuaciones utilizadas fueron desarrolladas específicamente para el cálculo de los pigmentos fotosintéticos de microalgas. Los datos obtenidos de clorofilas y ficobiliproteínas fueron normalizados con el fin de descartar resultados erróneos por dilución de los componentes en un mayor volumen de solvente.

$$\text{Chl a [mg/L]} = (16,5 * A_{665}) - (8,3 * A_{650}) \quad (1)$$

$$\text{Chl b [mg/L]} = (33,8 * A_{650}) - (12,5 * A_{665}) \quad (2)$$

$$\text{PC [mg/L]} = \frac{A_{650} - 0,7 * A_{665}}{7,38} \quad (3)$$

$$\text{APC [mg/L]} = \frac{A_{650} - 0,19 * A_{620}}{5,65} \quad (4)$$

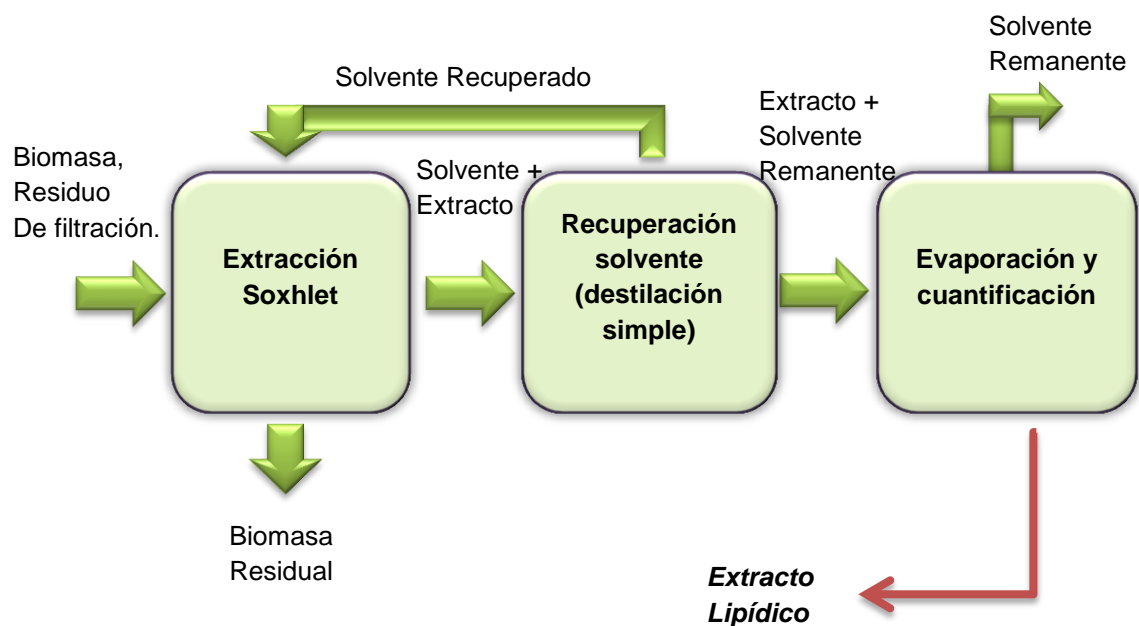
**Fuente: [17].**

## 2.4. Extracción de Lípidos

Teniendo ya seleccionado el solvente apolar para la extracción de lípidos, ésta se realiza por medio del método Soxhlet, el cual proporciona mayor eficiencia y es uno de los más selectivos garantizando la calidad del extracto [18], se utiliza la biomasa proveniente de la etapa de extracción de clorofilas y ficobiliproteínas, la biomasa es llevada al tubo Soxhlet, el cual se ubica sobre un balón aforado al que se le agrega 250 mL del solvente apolar seleccionado y por calentamiento se extraen los lípidos de la biomasa, este procedimiento tarda 18 horas, quedando el extracto lipídico en el balón aforado junto con parte del solvente apolar, el cual es recuperado por destilación simple, y el extracto lipídico se obtiene por volatilización del solvente restante en el balón.

Esta extracción, se llevó a cabo siguiendo las condiciones de operación establecidas de la metodología experimental, mostradas en el anexo A. El proceso general se ilustra en la figura 3.

**Figura 3. Metodología de Extracción de Lípidos.**



Los porcentajes conseguidos de clorofilas, ficobiliproteínas y extracto lipídico fueron calculados utilizando la ecuación 5.

$$\text{Porcentaje extraído} = \frac{\text{g de componente}}{\text{g de biomasa}} * 100\% \quad (5)$$

## **2.5. Análisis Estadístico**

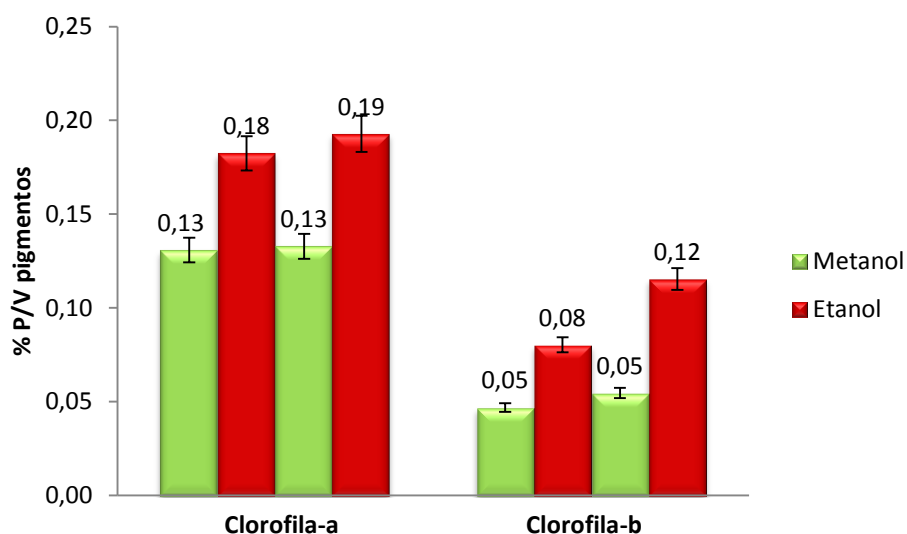
Se analizó la influencia de las variables temperatura, tiempo y relación biomasa/solvente de la etapa de agitación en la extracción de pigmentos (Chl-a, Chl-b, PC y APC) y lípidos para la biomasa de microalga *Amphipora* sp.; utilizando los diagramas de Pareto y superficie de respuesta en el software STATISTICA 7.0 con un intervalo de confianza del 95%.

## **3. RESULTADOS Y ANÁLISIS**

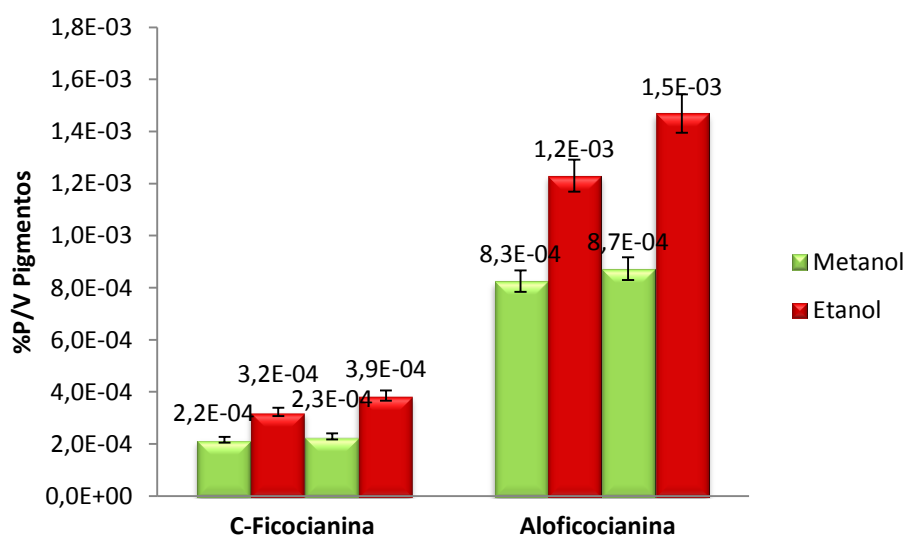
### **3.1. Elección de la Mezcla de Solventes**

Los resultados de la selección de la mejor mezcla de solventes (polar y apolar) para la extracción de pigmentos y aceite crudo, se muestran en las figuras 4, 5 y 6.

**Figura 4. Efecto del solvente polar sobre la concentración de Chl-a y Chl-b.**

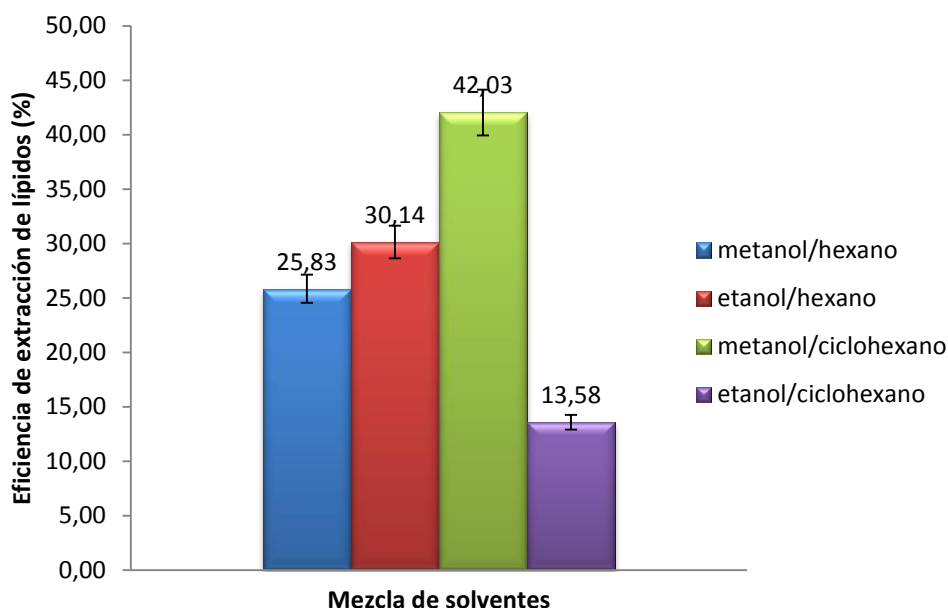


**Figura 5. Efecto del Solvente polar sobre la concentración de PC y APC.**



El mejor solvente polar para la extracción de pigmentos fue el etanol, ya que incrementó la cantidad de pigmentos extraídos en comparación con el metanol, este resultado confirma la eficiencia de dicho solvente para la extracción tanto de clorofilas como de ficobiliproteínas en la microalga *Amphiprora* sp., por tal motivo, se seleccionó etanol como solvente polar para posteriores pruebas.

**Figura 6. Efecto del solvente apolar sobre la eficiencia del extracto lipídico.**



En la figura 6 se muestra que para la extracción de lípidos la mejor mezcla de solventes es metanol/ciclohexano, seguida por las mezclas que utilizan hexano como solvente apolar y con la mas baja eficiencia se encuentra la mezcla etanol/ciclohexano, estos resultados se deben a la diferencia de polaridades que existe entre los solventes utilizados lo cual influye en el desplazamiento de los lípidos hacia la fase hidrofóbica [19], por lo cual podemos concluir que el solvente hexano es el solvente más conveniente para la obtención de lípidos de esta cepa. Se debe tener en cuenta también que con etanol se obtienen más clorofilas y ficobiliproteínas que con los sistemas que utilizan metanol.

Teniendo en cuenta las figuras 4, 5 y 6, y el objetivo de buscar un mayor aprovechamiento de la biomasa con el fin de obtener productos de alto valor, se seleccionó la mezcla de solventes etanol/hexano, ya que permite obtener la mayor eficiencia de extracción de clorofilas y ficobiliproteínas y una alta eficiencia de extracción de lípidos.

### 3.2. Estudio de Variables que Afectan la Extracción de Pigmentos y Lípidos

Los resultados del diseño experimental central compuesto (DCC) obtenido con el software STATISTICA 7.0 para el estudio de las variables que afectan la extracción de clorofilas, ficobiliproteínas y lípidos, se muestran en la tabla 4. Los datos sombreados son los resultados que representan los mejores porcentajes obtenidos a las diferentes condiciones de temperatura, tiempo y relación biomasa/solvente en la etapa de extracción de pigmentos.

**Tabla 4. Resultados de los diferentes pigmentos y lípidos extraídos.**

Prueba	Bloque	T [°C]	t [h]	Relación Bio/Ste [g/mL]	Porcentajes Extraídos (%)				
					Chl-a	Chl-b	PC	APC	Ext. Lipídico
1	1	35	6	90	0,17	0,16	4,3E-04	1,7E-03	0,74
2	1	55	6	30	0,51	0,59	1,4E-03	5,8E-03	0,85
3	1	55	2	90	0,50	0,48	1,3E-03	5,1E-03	0,12
4	1	45	4	60	0,26	0,24	6,4E-04	2,5E-03	0,12
5	1	35	2	30	0,46	0,39	1,1E-03	4,4E-03	0,75
6	2	45	4	60	0,24	0,25	6,3E-04	2,5E-03	1,54
7	2	35	2	90	0,17	0,13	3,8E-04	1,5E-03	1,41
8	2	55	6	90	0,18	0,18	4,7E-04	1,9E-03	0,72
9	2	35	6	30	0,44	0,42	1,1E-03	4,4E-03	1,21
10	2	55	2	30	0,26	0,24	6,5E-04	2,6E-03	0,85
11	3	45	4	110	0,16	0,13	3,8E-04	1,5E-03	0,04
12	3	45	4	60	0,32	0,30	7,9E-04	3,2E-03	1,86
<b>13</b>	<b>3</b>	<b>45</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>0,69</b>	<b>0,69</b>	<b>1,8E-03</b>	<b>7,2E-03</b>	<b>2,13</b>
14	3	45	7,35	60	0,21	0,28	6,5E-04	2,6E-03	0,60
15	3	28,3	4	60	0,27	0,21	6,1E-04	2,4E-03	0,35
16	3	45	0,65	60	0,26	0,24	6,5E-04	2,6E-03	0,49
17	3	61,7	4	60	0,22	0,26	6,4E-04	2,5E-03	0,66

Como se observa en la tabla 4, la prueba 13 fue la más exitosa obteniéndose los mayores porcentajes de extracción de clorofilas, ficobiliproteínas y lípidos, los resultados de las demás pruebas son variables dependiendo del producto de interés, se puede ver que la siguiente prueba que mejor extrae clorofilas y



ficobiliproteínas es la prueba 2, mientras que para la lípidos la siguiente mejor prueba es la 12.

### **3.3. Análisis Estadístico**

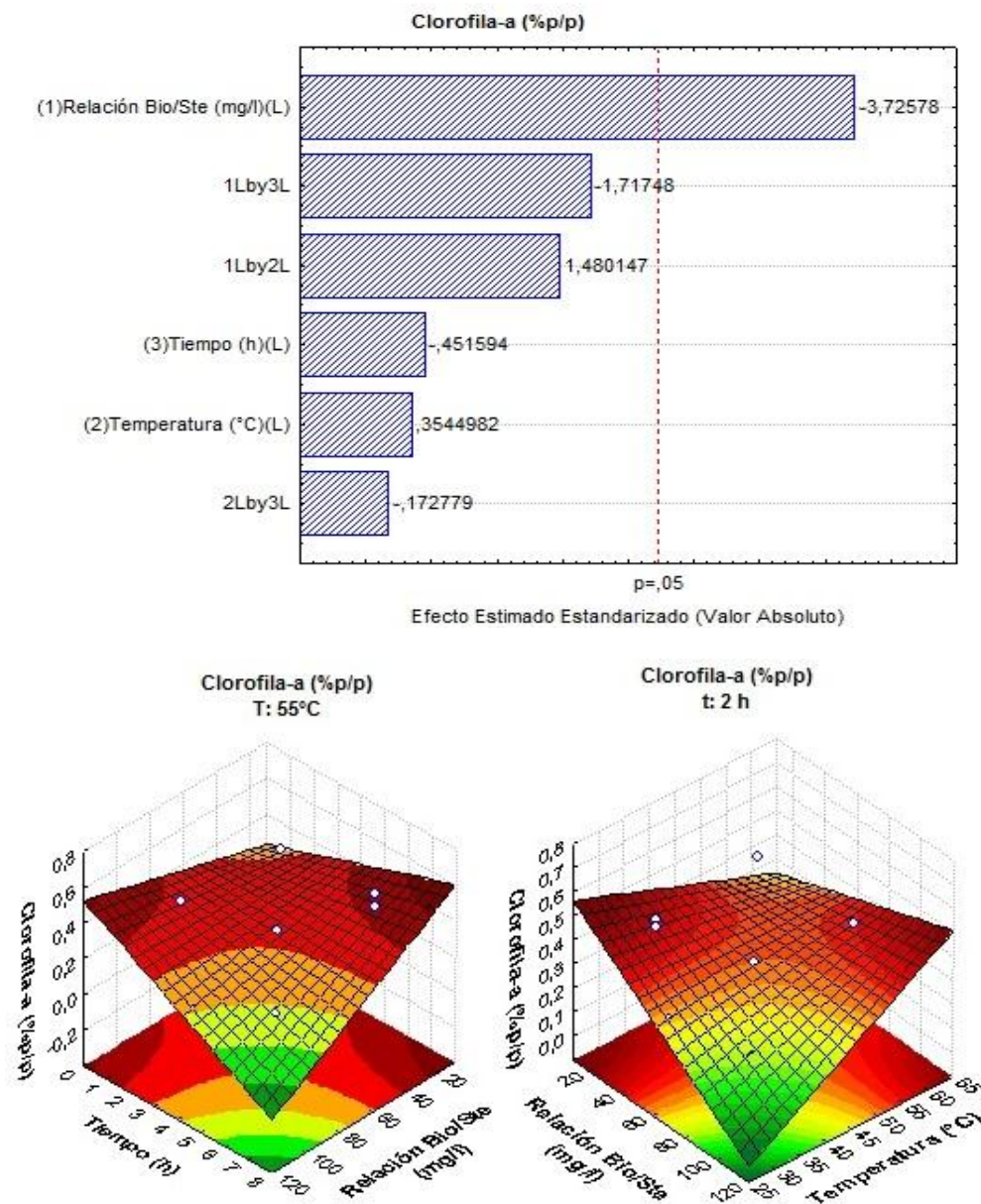
#### **3.3.1. Extracción de Clorofilas y Ficobiliproteínas**

Teniendo en cuenta los datos obtenidos por las ecuaciones 1-4 de la descripción metodológica, en las figuras 7, 8, 9 y 10, se muestran los diagramas de Pareto y de superficies de respuesta para observar el efecto que tienen las interacciones de las variables temperatura, tiempo y relación biomasa/solvente en la etapa de agitación sobre la extracción de clorofilas y ficobiliproteínas.

Donde el diagrama de Pareto muestra qué variables tienen una influencia significativa sobre la extracción de los diferentes pigmentos, esta significancia se aprecia cuando las variables cruzan el umbral (línea roja) con un valor  $p < 0,05$ .

Para el diagrama de superficie de respuesta se realizaron dos gráficos manteniendo constante en cada uno la mejor condición de temperatura y tiempo de agitación, para observar el efecto que tienen las interacciones tiempo y temperatura con respecto a la relación biomasa/solvente, donde se muestran las zonas de mayor (rojo) y menor (verde) porcentajes extraídos.

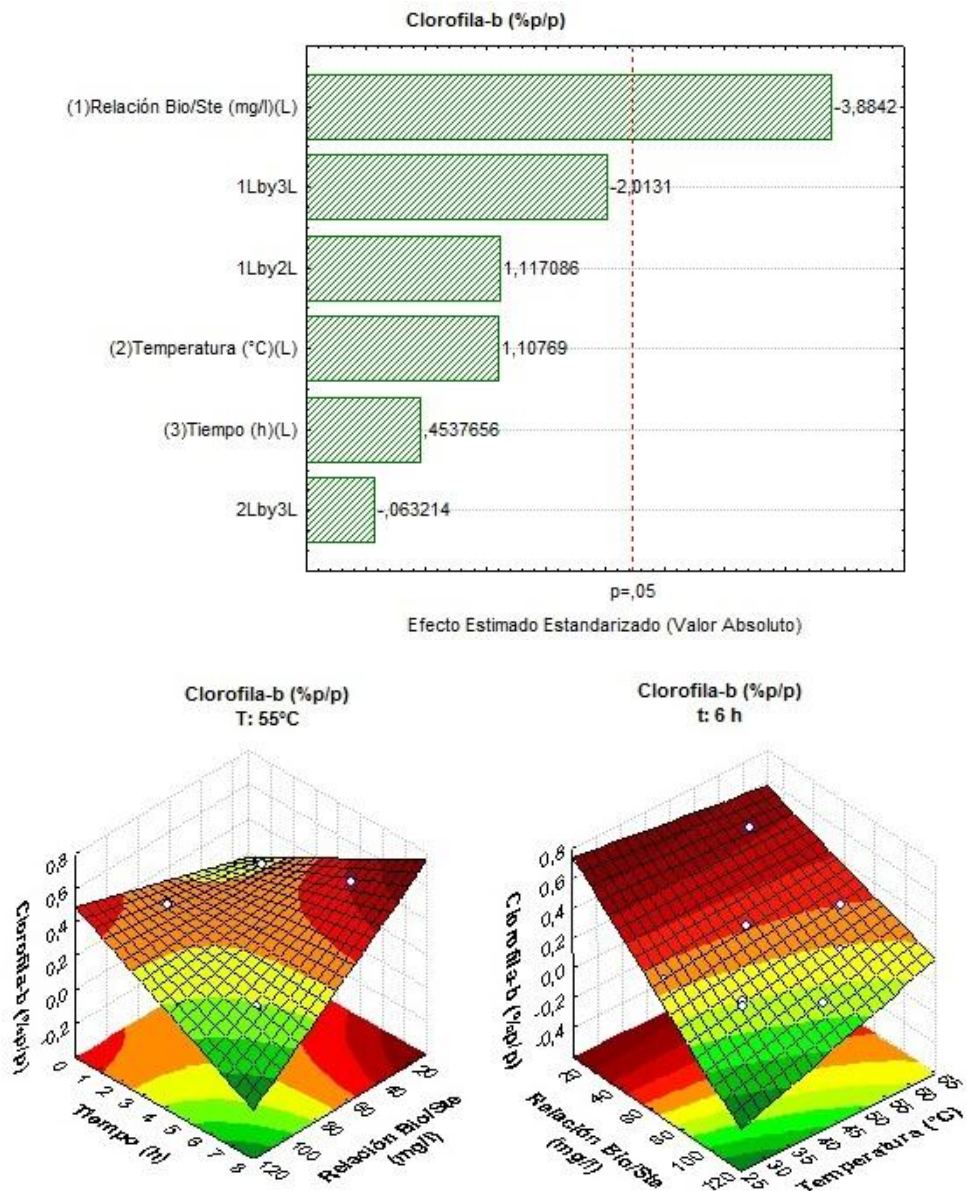
Figura 7. Diagramas de Pareto y de Superficie de Respuesta, para analizar el efecto de las variables estudiadas sobre la extracción de Chl-a.



En la figura 7 se puede observar que la única variable significativa es la relación biomasa/solvente influyendo negativamente, con lo cual para el diagrama de superficie de respuesta se grafican las interacciones con respecto al solvente; se puede ver que la temperatura y el tiempo de extracción tienen un efecto positivo y negativo respectivamente, aunque no es significativo; lo

que nos indica que se obtienen mejores rendimientos de extracción a temperaturas cercanas a 55 °C y tiempos de extracción cercanos a 2 h.

**Figura 8. Diagramas de Pareto y de Superficie de Respuesta, para analizar el efecto de las variables estudiadas sobre la extracción de Chl-b.**

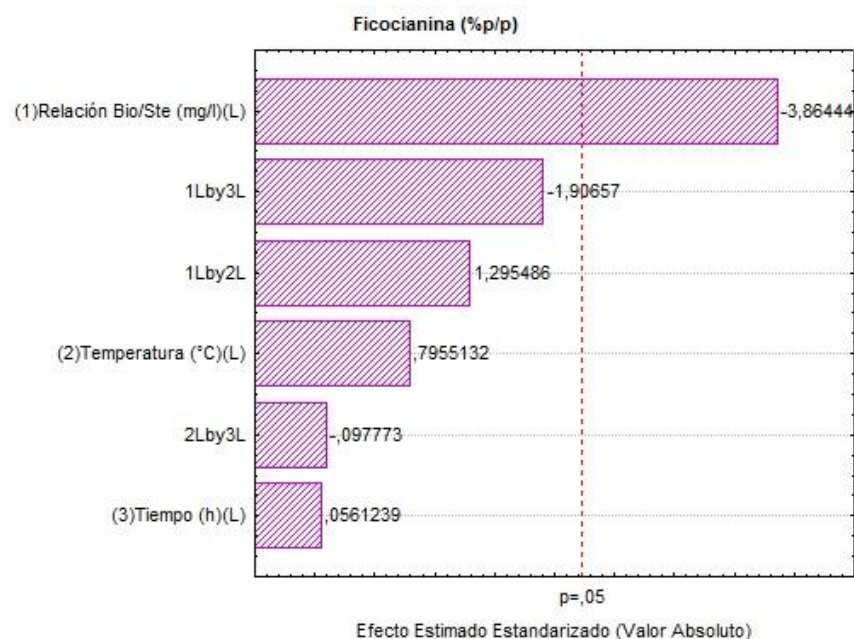


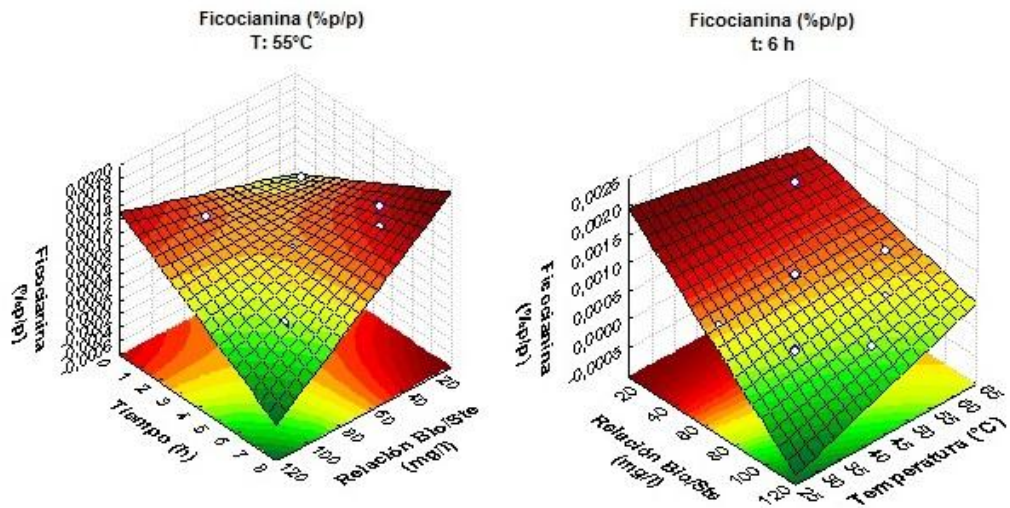
Para Chl-b al igual que para Chl-a la única variable que afecta significativamente es la relación biomasa/solvente influyendo negativamente

sobre la etapa de extracción, seguida de la interacción solvente-tiempo la cual a diferencia de las demás interacciones es la que más se acerca al umbral ( $p < 0,05$ ) influyendo también en forma negativa. Además, la variable tiempo presenta un efecto positivo contrario a la Chl-a, lo que indica que se obtienen mejores rendimientos en zonas cercanas a 55 °C y tiempos cercanos a 6 h de agitación como se puede apreciar en el diagrama de superficie de respuesta.

Para el caso de las ficocianinas, al igual que para las gráficas anteriores, la relación biomasa/solvente sigue siendo la única variable significativa y afecta negativamente la eficiencia de la extracción (Figura 9). Se observa también que la interacción biomasa/solvente- tiempo aunque no es significativa es la que tiene mayor influencia sobre las demás variables e interacciones, la cual influye de manera negativa, por lo que se obtienen mayores rendimientos a tiempos cercanos a 6 h, y con respecto a la temperatura, es una de las variables menos influyentes, pero que afecta de forma positiva.

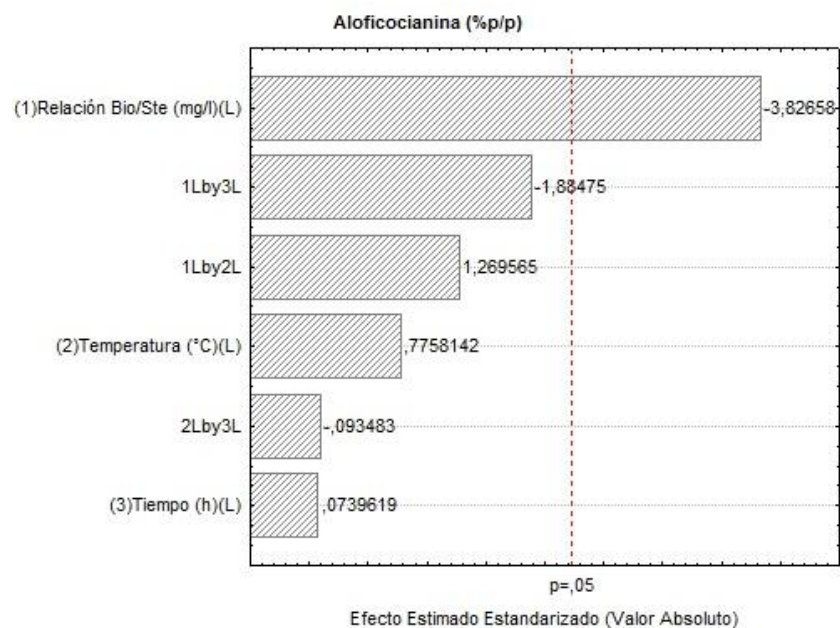
**Figura 9. Diagramas de Pareto y de Superficie de Respuesta, para analizar el efecto de las variables estudiadas sobre la extracción de PC.**

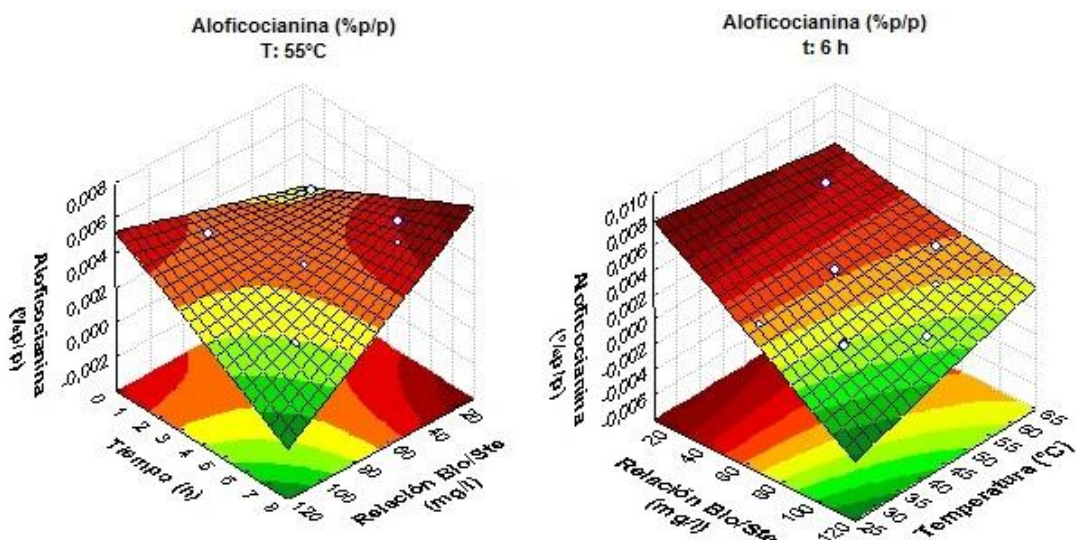




En la figura 10 se observa que el efecto de las variables sobre la extracción en APC tienen la misma tendencia que en las PC, pero es de tener en cuenta que el porcentaje de extracción es mayor en aloficocianinas; este comportamiento se debe a que las APC pertenecen al grupo de las ficobiliproteínas al igual que las PC, por lo que poseen propiedades similares.

**Figura 10. Diagramas de Pareto y de Superficie de Respuesta, para analizar el efecto de las variables estudiadas sobre la extracción de APC.**





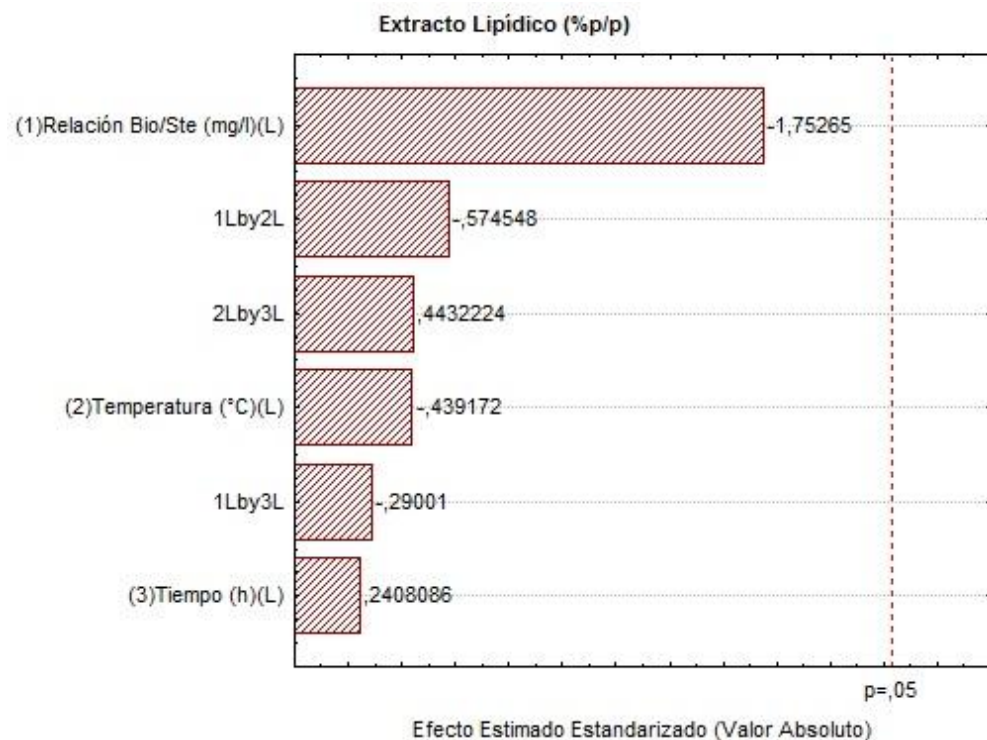
Como se observó en las gráficas 7, 8, 9 y 10, la única variable que tiene un efecto significativo para la extracción de clorofilas y ficobiliproteínas es la relación biomasa/solvente, la cual afecta de forma negativa, lo que indica que se debe realizar la extracción con relaciones biomasa/solvente cercanas a 1/30 g/mL para obtener mayores concentraciones de clorofilas y ficobiliproteínas; la temperatura tiene un efecto positivo, aunque no significativo, siendo más favorable utilizar temperaturas cercanas a 55 °C; para la variable tiempo, en todos los pigmentos excepto para la Chl-a, tuvo un efecto positivo, lo cual indica que es mas conveniente utilizar tiempos de extracción altos, y esto no afectaría de forma relevante la extracción de Chl-a, por ser una variable no significativa.

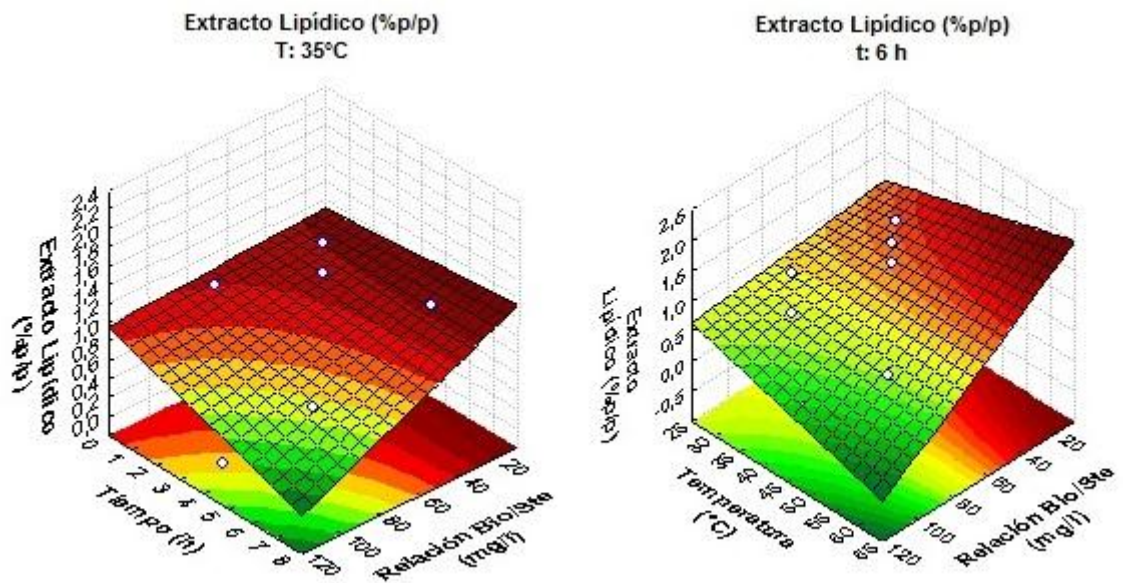
### 3.3.2. Extracción de Lípidos

Una vez obtenidos los datos de los extractos lipídicos en las pruebas Soxhlet; se muestran en la figura 11 los diagramas de Pareto y de superficie de respuesta para la extracción de lípidos donde se puede notar que los factores analizados en la etapa de extracción no presentan efectos significativos sobre

el rendimiento de la extracción de aceite crudo; sin embargo, tanto la concentración de solvente como la temperatura afectan de forma negativa la extracción, mientras que el tiempo de extracción de clorofilas y ficobiliproteínas actúa positivamente aumentando la extracción de lípidos. La interacción biomasa/solvente-tiempo y la variable tiempo son las que menos tienen influencia sobre la obtención del extracto lipídico, tal como se observa en la gráfica.

**Figura 11. Diagramas de Pareto y de Superficie de Respuesta, para analizar el efecto de las variables estudiadas sobre la extracción de lípidos.**





La figura 11 indica que la extracción de lípidos no se ve afectada significativamente por las variables que participan en la extracción de pigmentos y ficobiliproteínas, pero la variable biomasa/solvente es la que más tiene influencia sobre la extracción de lípidos y que al igual que para clorofilas y ficobiliproteínas este efecto es negativo. Se puede observar en el diagrama de superficie de respuesta que la interacción biomasa/solvente-temperatura influye negativamente, por lo que el rendimiento aumenta en zonas cercanas a 65 °C y 1/30 g/mL, este comportamiento se puede explicar porque las condiciones de operación que permiten una mayor extracción de clorofilas y ficobiliproteínas generan un debilitamiento de la pared celular de la microalga al descomponer el material celulósico presente en ésta, permitiendo en la siguiente etapa de extracción de lípidos un mayor contacto del hexano con el aceite, y facilitando la obtención del aceite crudo.



## CONCLUSIONES

1. Para biomasa seca de la microalga *Amphiprora* sp. las mejores condiciones de extracción fueron: temperatura de 45 °C, tiempo de 4 h y relación biomasa/solvente de 1/10 g/mL, tanto para extracción de clorofilas y ficobiliproteínas como para lípidos.
2. El análisis estadístico de los resultados mostró que la relación biomasa/solvente es la única variable significativa para la extracción de clorofilas y ficobiliproteínas, y poco significativa (pero mas influyente que las otras variables: temperatura y tiempo) en la extracción de aceite crudo.
3. Se encontró que los altos costos de clorofilas y ficobiliproteínas a pesar de su baja producción contribuyen positivamente a la economía global del proceso para la producción de biodiesel en la microalga *Amphiprora* sp., abordando el concepto de biorefinería.

## RECOMENDACIONES

1. Estudiar la obtención de otros posibles co-productos como azúcares fermentables y otras proteínas, con el fin de desarrollar una topología de biorefinería en microalgas económicamente más viable.
2. Aplicar la metodología desarrollada para este estudio a otras cepas de microalgas ricas en sustancias especiales.

## REFERENCIAS

- [1] PALOMINO, M. LÓPEZ, G. Microalgas: Potencial para la producción de biodiesel. Cali, Colombia. 2010. I Simposio Internacional de Oleaginosas Energéticas. Universidad del Valle. Facultad de Ingenierías.
- [2] SERRA, J. Biotecnología con Microalgas. España. 2009. Universidad del País Vasco. Facultad de Ciencia y Tecnología. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Grupo de Tecnología Enzimática y Celular.
- [3] ALBARRACÍN, I. La producción de Biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. Microalgas: Potenciales Productoras de Biodiesel. XV Simposio Electrónico internacional, 2007. Centro de Estudios Internacionales para el Desarrollo.
- [4] ÁLVAREZ, L. PIEDRASANTA, B. Extracción de metabolitos solubles en dióxido de carbono en condiciones supercríticas a partir de hojas deshidratadas de espinaca (*spinacia oleracea*). Guatemala, 2011. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química.
- [5] FELIPE, M. BERMEJO, R. obtención de biliproteínas de interés biotecnológico industrial mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. España, 2006. Universidad de Jaén. Departamento química, física y analítica.
- [6] RAMÍREZ, L. OLVERA, R. Uso Tradicional y Actual de Spirulina SP. (*Arthrospira SP.*). Caracas, Venezuela, 2006. Interciencia, Vol. 31, número 009, pp. 657-663.
- [7] GÓMEZ, L. Cultivo y Aplicación de las Microalgas *Dunaliella Salina* y *Chlorella Vulgaris* en cuba.1997. Universidad De Coruña. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Celular y Molecular.
- [8] ROMAY, CH. GONZÁLEZ, R. Actividad Antioxidante de la Ficocianina Frente a Radicales Peroxílicos y la Peroxidación Lipídica Microsomal. Revista Cubana Invest Biomed. 2001. Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

[9] FREILE, Y. "Algas en la Botica". ¿Qué es un Alga? Avance y Perspectiva, Vol20,2001.[enlínea].<[http://biblioteca.cinvestav.mx/indicadores/texto\\_completo/cinvestav/2001/90989\\_2.pdf](http://biblioteca.cinvestav.mx/indicadores/texto_completo/cinvestav/2001/90989_2.pdf)> [citado marzo de 2012].

[10] AICHELE, X. ROMERO, M. Efecto de la Radiación UV-b en la Síntesis de Pigmentos Protectores y Fotosintéticos en Plántulas de *Aextoxicon punctatum*. Chile, 2006. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias, Escuela de Química y Farmacia.

[11] MANRIQUE, E. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. Centro de Ciencias Medioambientales, 2003. CSIC. Serrano nº 115 Dpdo, 28006 Madrid.

[12] ROSAS, C. GÓMEZ, I. Pigmentos Fotosintéticos en la Columna de Agua Determinados Mediante Técnicas Espectroscópicas y Cromatográficas (hplc-rp): Variabilidad Espacio-Temporal y Efectos de Radiación UV. Chile, 2007. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias.

[13] LAGOS, D. CRISTANCHO, Y. Productividad de Pigmentos de Valor Agregado en *chlorella vulgaris* UTEX 1803 utilizando como Medio de Cultivo Diferentes Fuentes de Carbono Orgánico. Bucaramanga, Colombia, 2011. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-químicas. Escuela de Ingeniería Química.

[14] WIJFFELS, R. BARBOSA, M. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. 2010. Vol.4 pag 287-295.

[15]Alibabagroup.Basededatos[enlínea].<[http://www.alibaba.com/trade/search?Country=&IndexArea=product\\_en&fsb=y&SearchText=chlorophyll+extract](http://www.alibaba.com/trade/search?Country=&IndexArea=product_en&fsb=y&SearchText=chlorophyll+extract)> [citado en abril de 2012].

[16] ANTOLÍN. G. Concepto de biorefinería. Energía del siglo XXI. Conferencia Valdivia (Chile). (2009). Centro Tecnológico CARTIF.

[17] BECKER. E. Microalgae. Biotechnology and Microbiology. Cambridge, University Press, 2008. ISBN 0-521-35020-4.

[18] LÓPEZ. L. CÓRDOBA. L. Obtención de Aceite de Microalgas Nativas Mediante la Combinación de Disrupción Celular y Método de Extracción Soxhlet para la Producción de Biodiesel. Bucaramanga, Colombia. 2010. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química.

[19] Cianytech, Ciencia y tecnología. Miscibilidades entre disolventes. [en línea] <<http://www.cianytech.com/tablas/tabla-miscibilidades.pdf>> [citado en 15 abril de 2012].

## BIBLIOGRAFÍA

AMINOT, A. REY, F. Standard procedure for the determination of chlorophyll *a* by spectroscopic methods. International Council for the Exploration of the Sea. March 2000. ISSN 0903-2606.

ARAR, E. Method 446.0 *In Vitro* Determination of Chlorophylls *a*, *b*, *c* + *c* and Pheopigments in Marine And Freshwater Algae by Visible Spectrophotometry. September 1997. National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio 45268.

DER-BAI, M. Microalgal pigments potential as byproducts in lipid production. JTICE-313; No. of Pages 4. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers (2011).

DERE, S. GÜNES, T. SIVACI, R. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. Tr. J. of Botany 22 (1998) 13-17.

GONZÁLEZ, A. KAFAROV, V. Microalgae Based Biorefinery: issues to consider. Bucaramanga, Colombia, 2011. Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-químicas. Escuela de Ingeniería Química.

HENRIQUES, M. SILVA, A. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology (2007). Escola Superior Agrária de Coimbra, Polytechnic Institute of Coimbra, 3040 – 316 Coimbra, Portugal.

HUANG, T. CONG, H. A New Method for Determination of Chlorophylls in Freshwater Algae. *Environ Monit Assess* (2007) 129:1–7.

MENDES\_PINTO, M. RAPOSO, J. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *Journal of Applied Phycology* 13: 19–24, 2001.

PÁPISTA, E. Chlorophyll-a determination with ethanol - a critical test. *Hydrobiologia* 485: 191–198, 2002.

RAYMOND, R. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res* (2006) 89:27–4.

SCHUMANN, N. Chlorophyll extraction methods for the quantification of Green microalgae colonizing building facades. *International Biodeterioration & Biodegradation* 55 (2005) 213–222.

SINGH, P. SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science* 37 (2011) 52-68.

## ANEXOS

### Anexo A. EXTRACCIÓN DE ACEITE CRUDO MEDIANTE EL MÉTODO SOXHLET

#### **Materiales y Reactivos:**

- Manta de Calentamiento.
- Equipo de Extracción Soxhlet (matraz, tubo Soxhlet, condensador).
- Papel filtro.
- Soporte universal.
- Espátula.
- Mortero.
- Desecador.
- Embudo.
- Balanza analítica.
- Hexano.
- Cámara de extracción de vapores.

#### **Procedimiento del método de Extracción Soxhlet**

- a) Pesar 1 g de biomasa pretratada.
- b) Introducir la biomasa en el papel filtro y formar el cartucho.
- c) Agregar 250 mL de hexano en el matraz.
- d) Hacer montaje Soxhlet
- e) Recuperar el solvente por medio de destilación simple.
- f) Dejar volatilizar el extracto y la biomasa residual en una cámara extractora hasta obtener peso constante.
- g) Cuantificar el extracto obtenido por diferencia de masa.





a)

Biomasa Macerada



b)

Cartucho con biomasa



c)

Montaje Soxhlet



d)

Solvente Remanente



Extracto Lipídico