

**OBTENCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS NATIVAS MEDIANTE LA
COMBINACIÓN DE DISRUPCIÓN CELULAR Y MÉTODO DE
EXTRACCIÓN SOXHLET PARA LA PRODUCCIÓN DE BODIESEL**

**LUZ STELLA CÓRDOBA CARREÑO
LINA MARCELA LÓPEZ CHOGÓ**

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

2010

**OBTENCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS NATIVAS MEDIANTE LA
COMBINACIÓN DE DISRUPCIÓN CELULAR Y MÉTODO DE
EXTRACCIÓN SOXHLET PARA LA PRODUCCIÓN DE BODIESEL**

**LUZ STELLA CÓRDOBA CARREÑO
LINA MARCELA LÓPEZ CHOGÓ**

**Trabajo de grado para optar al título de
Ingeniero Químico**

Director

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

Codirectores

**ALEXANDER GUZMÁN MONSALVE
Químico Ph. D.**

Instituto Colombiano del Petróleo ICP- ECOPETROL

**ANGEL DARÍO GONZÁLEZ DELGADO
Ingeniero Químico**

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

2010

*A DIOS por guiarme y darme la fortaleza para alcanzar cada uno de mis logros,
A mis padres Graciela y Ricardo por su infinito amor, dedicación, comprensión, ayuda incondicional,
enseñanzas y consejos,
A mis hermanos Claudia y Germán por todo el cariño y colaboración que me han brindado,
A Nelson por su paciencia, afecto, comprensión, y apoyo constante...,
A mi compañera y amiga Lina Marcela por su esfuerzo, dedicación y paciencia para lograr la culminación
de este proyecto,
A todos mis amigos, en especial a Ana, Andrea, Marly, Leislly, Silvia, Andrea J, Liliana X, Luis G, Juan
M con quienes he compartido momentos inolvidables, siempre los llevaré en mi corazón,
MUCHAS GRACIAS a todos*

LUZ STELLA CÓRDOBA CARREÑO

*A Dios, por darme la fuerza necesaria para lograr todas las metas que me he propuesto,
A mi madre Melida, por su inmenso amor, dedicación y sacrificio. Eres el motivo de mi existir,
A Jhon por su amor, comprensión y apoyo incondicional,
A todos mis amigos, especialmente a Leidy y Juan Manuel por todos y cada uno de los momentos que
compartimos, por su cariño y apoyo incondicional. Siempre los llevaré en mi corazón,
A Luz Stella, gracias por la paciencia y esfuerzo para lograr culminar este proyecto.*

LINA MARCELA LÓPEZ CHOGÓ

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el apoyo brindado mediante el proyecto “Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel” código 2008D32006-6710.

Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL por los aportes en conocimiento y experiencia de sus profesionales, en especial a Alexander Guzmán Monsalve Químico Ph.D y al Dr. Nelson Moreno Safra.

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

Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov por su valioso aporte y constante colaboración durante la realización del proyecto de investigación.

Ing. Angel Darío González por su dedicación, paciencia y apoyo incondicional en el desarrollo del presente trabajo investigativo.

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

Eduardo Carreño y Wilson Carreño técnicos del laboratorio de procesos de Ingeniería Química, por su ayuda, enseñanzas y orientación durante la ejecución de las pruebas experimentales.

Nuestros amigos y compañeros de estudio por su comprensión y compañía.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN	17
1. CONCEPTOS TEÓRICOS	18
1.1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS	18
1.1.1 Composición química	18
1.1.2 Descripción de los géneros de microalgas utilizadas	19
1.1.2.1 <i>Amphiprora</i> sp.	19
1.1.2.2 <i>Desmodesmus</i> sp.....	19
1.1.2.3 <i>Tetraselmis</i> sp.	19
1.2 PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS.....	19
1.3 OBTENCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS.....	20
1.3.1 Disrupción celular.....	20
1.3.2 Métodos de extracción de aceite.....	21
1.3.2.1 Método de extracción Soxhlet.....	22
1.3.2.2 Variables del proceso de extracción de aceite mediante el método Soxhlet.	23
1.4 CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE DE MICROALGAS	24
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	25
2.1 MATERIALES	25
2.1.1 Materia prima	25
2.1.2 Reactivos y equipos	25
2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	26
2.2.1 Método de disrupción celular.....	26
2.2.2 Proceso de extracción y cuantificación del extracto	28
2.3 METODOLOGÍA	29

2.3.1 Etapa 1: Evaluación de diferentes métodos de disrupción celular	29
2.3.2 Etapa 2: Evaluación de la influencia del solvente y tiempo de extracción en el porcentaje de extracto lipídico obtenido mediante el método Soxhlet	30
2.3.2.1 Evaluación y selección del solvente.....	30
2.3.2.2 Evaluación y selección del tiempo de extracción	31
2.3.2.3 Aplicación de las mejores condiciones a otro género de microalga.	31
2.3.3 Etapa 3: Caracterización de los extractos lipídicos obtenidos.....	32
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	33
3.1 MÉTODO DE DISRUPCIÓN CELULAR	33
3.1.1 Porcentaje de masa solubilizada.....	33
3.1.2 Influencia del método de disrupción en el porcentaje de extracción ...	35
3.2 SELECCIÓN DEL SOLVENTE DE TRABAJO.....	37
3.3 ELECCIÓN DEL TIEMPO DE OPERACIÓN	38
3.4 MEJORES CONDICIONES EXPERIMENTALES OBTENIDAS	39
3.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS	41
4. CONCLUSIONES	44
5. RECOMENDACIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS.....	52

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición química de los géneros de microalgas empleadas	25
Tabla 2. Métodos de disrupción celular evaluados	27
Tabla 3. Pruebas realizadas para la elección del método de disrupción	29
Tabla 4. Pruebas realizadas para la determinación del solvente	31
Tabla 5. Pruebas realizadas para la selección del tiempo de extracción	31
Tabla 6. Pruebas con el género <i>Tetraselmis</i>	32
Tabla 7. Eficiencia de la extracción con relación al método de disrupción empleado	36
Tabla 8. Eficiencia del proceso de extracción en relación al solvente de trabajo	38
Tabla 9. Eficiencia de la extracción con relación al tiempo de operación	39
Tabla 10. Eficiencia del proceso de extracción con las mejores condiciones	40
Tabla 11. Principales ácidos grasos del aceite de microalgas	42
Tabla 12. Cantidad estimada de acilgliceroles	43
Tabla A1. Contenido lipídico de algunas microalgas	52
Tabla B1. Mezcla de microalgas, lípidos, carbohidratos y proteínas usadas para evaluar la factibilidad de la determinación indirecta del análisis proximal de las cepas de microalgas	54
Tabla B2. Valores de contenido de lípidos reales y predichos por análisis PLS de la primera derivada de los espectros ATR-MIR	55
Tabla C1. Reactivos químicos empleados en el desarrollo experimental	56
Tabla D1. Equipos empleados en el desarrollo experimental	57
Tabla F1 Resultados obtenidos en la caracterización para algunos extractos	67

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Equipo de extracción Soxhlet	22
Figura 2. Pasos para aplicar el método de disrupción celular	26
Figura 3. Diagrama de bloques: extracción y cuantificación	28
Figura 4. Etapas del desarrollo metodológico	29
Figura 5. Fases para la evaluación del solvente y tiempo de extracción	30
Figura 6. Masa solubilizada [%] de acuerdo al método de disrupción celular	33
Figura 7. Masa solubilizada [%] de acuerdo al género de microalga	34
Figura 8. Porcentaje de extracto lipídico obtenido al variar el método de disrupción	35
Figura 9a. Pérdida de solvente [%] durante el proceso de extracción	37
Figura 9b. Porcentaje de extracto lipídico obtenido variando el solvente	37
Figura 10. Porcentaje de extracto lipídico al variar el tiempo de extracción	38
Figura 11. Resultados obtenidos con las mejores condiciones para los tres géneros de microalgas	40
Figura 12. Algunos extractos lipídicos obtenidos en las pruebas realizadas	41

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Contenido lipídico de algunas especies de microalgas	52
ANEXO B. Método empleado por el Instituto Colombiano del petróleo ICP-ECOPETROL para la caracterización de la biomasa	53
ANEXO C. Ficha técnica de reactivos	56
ANEXO D. Principales equipos empleados	57
ANEXO E. Descripción del procedimiento con el cual se obtienen los mejores resultados	59
ANEXO F. Perfil cromatográfico de ácidos grasos	64

RESUMEN

TÍTULO: OBTENCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS NATIVAS MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE DISRUPCIÓN CELULAR Y MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL *

AUTORES: LUZ STELLA CÓRDOBA CARREÑO, LINA MARCELA LÓPEZ CHOGÓ **

PALABRAS CLAVES: Soxhlet, aceite de microalgas, disrupción celular, biodiesel

DESCRIPCIÓN:

La producción de biocombustibles presenta un crecimiento acelerado en todo el mundo. Los altos precios del petróleo y a la necesidad de mitigar la contaminación ambiental asociada con el consumo de combustibles fósiles han impulsado su investigación y desarrollo. Dentro de estos, una opción promisoría son los biocombustibles de tercera generación; en especial el biodiesel a partir de microalgas, cuya sostenibilidad depende en gran medida de la eficiencia en la extracción de los aceites.

En el desarrollo del presente trabajo se empleó un procedimiento basado en disrupción celular y método de extracción Soxhlet como una alternativa en la obtención de aceite a partir de microalgas a nivel de laboratorio. Con dicho procedimiento se evaluó el efecto de varios métodos de disrupción celular (Metanol-H₂SO₄, Metanol-HCl, HCl 4[M] 1 min y HCl 0,5[M] 30 min), solventes (hexano, ciclohexano y etanol) y tiempos de operación (4, 6 y 8 horas) en el porcentaje de extracto lipídico, seleccionando las condiciones experimentales que permitieron alcanzar una mayor eficiencia del proceso de extracción, y aplicándolas a tres géneros de microalgas nativas *Amphiprora*, *Desmodesmus* y *Tetraselmis*.

Los mayores rendimientos de extracción del aceite de microalgas, se consiguen al utilizar el método de disrupción celular metanol-H₂SO₄, solvente hexano y un tiempo de operación de 8 horas. Logrando para todos los géneros utilizados una eficiencia del proceso superior al 50 %, y siendo la cepa *Tetraselmis* sp. la más promisoría en dicho aspecto.

Este trabajo fue realizado dentro del proyecto Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel código 2008D32006-6710, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en cooperación con el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP-ECOPETROL) y la Corporación Instituto Morrosquillo.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química.

Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Codirectores: Químico Ph.D. Alexander Guzmán Monsalve y Ing. Angel Darío González

ABSTRACT

TITLE: OBTAINING MICROALGAE OIL BY JOINT CELL DISRUPTION AND SOXHLET EXTRACTION FOR BIODIESEL PRODUCTION *

AUTHORS: LUZ STELLA CÓRDOBA CARREÑO, LINA MARCELA LÓPEZ CHOGÓ **

KEYS WORDS: Soxhlet, microalgae oil, cell disruption, biodiesel.

DESCRIPTION:

Biofuel production has been growing worldwide. High oil prices and the need to mitigate the environmental pollution associated with the consumption of fossil fuels has boosted its research and development. Third generation biofuels as biodiesel production from microalgae, are a promising alternative for supply the global demand of fossil derived fuels, the sustainability of biodiesel production chain depends in a great way of the oil extraction efficiency.

In the present study, a joint procedure based on cell disruption and Soxhlet extraction method was evaluated as an alternative for obtaining oil from microalgae in the laboratory. With this procedure, the effects of different cell disruption methods (methanol-H₂SO₄, methanol-HCl, HCl 4 [M] 1 min and HCl 0.5 [M] 30 min), solvents (hexane, cyclohexane and ethanol) and extraction times (4, 6 and 8 hours) on the percentage of lipid extract were evaluated. The best experimental conditions were selected in order to increase the extraction efficiency and were applied to three genuses of native microalgae, *Amphiprora*, *Desmodesmus* and *Tetraselmis*.

The highest oil yield from native microalgae was achieved by employing the methanol-H₂SO₄ cell disruption method, the best solvent was hexane and the extraction time was 8 hours. In addition, extraction efficiency was over 50% for all genuses used, and within them, *Tetraselmis* sp. shown the highest efficiency.

This work was developed within the project Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de Biodiesel code 2008D32006-6710, funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development, in cooperation with the Colombian Petroleum Institute (ICP-ECOPETROL) and the Institute Morrosquillo Corporation.

* Degree Project

** Faculty of Physical-Chemical Engineering. Chemical Engineering Department.

Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Co-directors Ph.D. Alexander Guzmán Monsalve and Ing Angel Darío González

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los altos precios del petróleo, y el agotamiento de los combustibles fósiles junto a la problemática medioambiental que conlleva su uso, han motivado el creciente interés de los investigadores en la producción de biocombustibles, dentro de ellos, una alternativa energética promisoría es el biodiesel a partir de microalgas [1,2]. Esta materia prima es interesante dadas las ventajas que ofrece en contraste con las plantas oleaginosas, tales como: mayor eficiencia fotosintética, una mayor producción de biomasa sostenida durante todo el año, la capacidad de crecer tanto en aguas marinas, dulces y residuales, así como su velocidad de crecimiento relativamente alta [3,4]. Sumado a lo anterior, la ventaja competitiva más importante del uso de microalgas para la obtención de biodiesel, consiste en los rendimientos lipídicos por unidad de área considerablemente superiores a los obtenidos con plantas oleaginosas [5].

La cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas es un proceso conformado, en términos generales, por las etapas de cultivo, cosecha de la biomasa, secado, extracción de lípidos y transesterificación [1]. Puesto que la factibilidad de la elaboración de biodiesel depende en gran medida de la eficiencia en la extracción del aceite, es en esta etapa del proceso en la cual se centra el presente trabajo, cuyo propósito es obtener aceite a partir de microalgas a nivel de laboratorio mediante la combinación de disrupción celular y método de extracción Soxhlet.

En el desarrollo metodológico se evalúa la influencia de algunas variables en el rendimiento de la extracción, tales como el método de disrupción celular, solvente empleado y tiempo de operación, con el fin de determinar las mejores condiciones que permitan alcanzar una mayor eficiencia en el proceso y sirvan para orientar posteriores estudios encaminados a la conformación de una cadena de producción sostenible de biodiesel a partir de microalgas nativas.

1. CONCEPTOS TEÓRICOS

En este capítulo se presentan aspectos generales de las microalgas y de los géneros utilizados, así como las principales características del aceite proveniente de esta materia prima. Igualmente, se describen generalidades del método de extracción Soxhlet haciendo hincapié en las variables de mayor importancia en este proceso.

1.1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de organismos microscópicos fotosintéticos [6]. Se consideran uno de los grupos de organismos más versátiles en términos de su tamaño, forma y función ecológica [7]. Estos convierten la luz del sol, el agua, nutrientes inorgánicos y el dióxido de carbono en biomasa, produciendo eficientemente lípidos, carbohidratos, y proteínas en diferentes proporciones [8].

En la actualidad se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000. Las microalgas pueden adaptarse a vivir en gran variedad de hábitats tales como aguas marinas, dulces y residuales, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes [9,10]. La reproducción de microalgas se produce principalmente por división celular (asexual), aunque la reproducción sexual puede ocurrir en muchas especies en condiciones adecuadas de crecimiento [6].

1.1.1 Composición química

La composición química de las microalgas es muy variable debido a factores tales como especie, tiempo de cosecha, nutrientes presentes en medio de cultivo, temperatura, fotoperíodo, salinidad, fuente de carbono, intensidad y color de la luz entre otros [11]. Generalmente la biomasa está constituida por 20-40% de lípidos, de 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 otros compuestos de importancia menor. Sin embargo, para los lípidos se han reportado valores en un rango del 1 al 70%, o incluso superiores [7,12]. En el Anexo A se muestra el contenido de lípidos en diferentes especies de microalgas.

1.1.2 Descripción de los géneros de microalgas utilizadas

1.1.2.1 *Amphiprora* sp. Ehrenberg, 1843. Es una diatomea (Bacillariophyceae), posee tallas cercanas a las 20 micras y forma rectangular 2:3. Se caracteriza por un rápido crecimiento y contenido de lípidos elevado (generalmente del 37%). Su pared celular o frústula de color amarillo oro consta de dos mitades que se sobreponen y adaptan entre sí, constituyendo las valvas [13].

1.1.2.2 *Desmodesmus* sp. Friedl & Hegewald, 1999. Es una microalga que pertenece a la clase Chlorophyceae (algas verdes) específicamente a la familia de Scenedesmaceae. Es abundante en los ecosistemas de agua dulce, y sus células son cilíndricas unidas lateralmente en grupos. Además se caracterizan por un alto grado de flexibilidad que les permite resistir condiciones adversas [14].

1.1.2.3 *Tetraselmis* sp. Stein, 1878. Es una microalga móvil que pertenece a la clase Prasinophyceae, se caracteriza por ser unicelular, de forma elipsoidal comprimida con 4 flagelos de tamaño similar. Es de color verde brillante, y por lo general crece 14 µm de ancho por 10-16 µm de largo. Contiene aproximadamente 49,2% de proteína, 16,4% de carbohidratos y un nivel de lípidos de 10% a 45% [15,16].

1.2 PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS

Las microalgas tienen la ventaja de producir aproximadamente 30 veces más aceite por hectárea que los cultivos actuales utilizados para la elaboración de biocombustibles (cultivos oleaginosos terrestres) y además no ponen en peligro la producción de alimentos [9]. Las microalgas más utilizadas para la producción de

biodiesel corresponden a las microalgas clasificadas como diatomeas y algas verdes [17].

El proceso de producción de biodiesel está conformado en términos generales por las etapas de cultivo de microalgas, cosecha, secado, extracción lipídica y transesterificación. Las microalgas por lo general se cultivan en sistemas abiertos (estanques naturales o artificiales, lagos y lagunas), y sistemas cerrados (fotobiorreactores). Seguidamente se da inicio a la etapa de cosecha con el propósito de remover el agua y concentrar las células, esta se puede realizar comúnmente por centrifugación, sedimentación, filtración y floculación [1,7]. Luego de la recolección, para aumentar la vida útil de la biomasa es común aplicar deshidratación mediante métodos como secado al sol, por aspersión, y liofilización [18]. Finalmente, se extraen el aceite mediante procedimientos mecánicos, químicos o enzimáticos, y este es transformado en biodiesel y glicerol, mediante la reacción de transesterificación alcalina [1].

Por su parte, la biomasa residual de la producción de biodiesel puede ser potencialmente utilizado para la alimentación animal, y también para producir metano por la digestión anaeróbica [3].

1.3 OBTENCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS

En la obtención de aceite de microalgas se puede identificar generalmente dos etapas importantes como lo son la aplicación de un método de disrupción celular y la extracción del aceite.

1.3.1 Disrupción celular

El principal problema a la hora de realizar la extracción del aceite de las microalgas es el rompimiento de la pared celular, puesto que algunas especies como por ejemplo *Botryococcus braunii*, poseen una matriz celular compleja, otras como las diatomeas, poseen frústulas de hidratos de sílice, las cuales las protegen. Por tanto, la ruptura celular es particularmente compleja, debido a la

diferencia que existe a nivel de composición de pared celular entre los diferentes géneros de microalgas [19].

Pese a las dificultades que se puedan presentar, el método de disrupción celular es de gran importancia en la obtención de los productos intracelulares de los microorganismos, y es clave para aumentar la eficiencia en la extracción de lípidos, puesto que al romper la estructura celular, más lípidos almacenados dentro de las células pueden ser liberados favoreciendo el contacto de estos con el solvente orgánico [20,21]. Hay varias formas en que disrupción se puede lograr, con base en la acción mecánica, como homogeneizadores, molinos de grano y ultrasonidos, o la acción no mecánica, por ejemplo congelación, hidrólisis y shock osmótico [19,22]. La mayoría de los métodos de disrupción desarrollados para el uso de microorganismos no-fotosintéticos se puede aplicar a microalgas [23].

Al someter la biomasa a un método de disrupción celular como la hidrólisis, los componentes hidrosolubles presentes en la pared celular son disueltos por el agente disruptor empleado, este material disuelto se denomina masa solubilizada.

1.3.2 Métodos de extracción de aceite

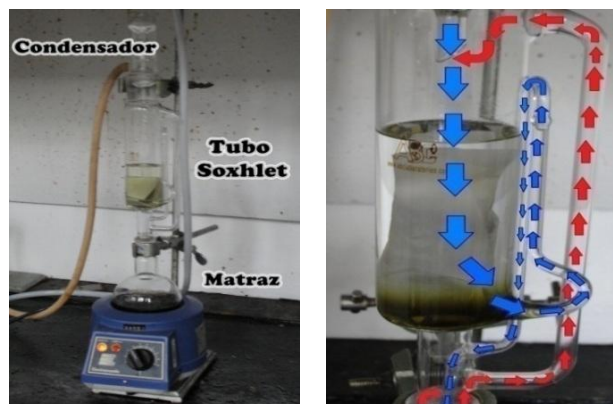
Existen varios métodos para extraer aceite de microalgas, como por ejemplo, extracción con solventes químicos, shock osmótico, fluidos supercríticos, autoclave, ultrasonido, extracción enzimática, destrucción mecánica y extracción asistida con microondas [24].

Particularmente, la extracción con solventes químicos es una técnica que consiste en usar un solvente (un líquido capaz de disolver otra sustancia) para extraer selectivamente compuestos de interés presentes en una muestra. Dentro de estos métodos de extracción se encuentran principalmente Bligh & Dyer [25], Folch *et al* [26], Ramírez-Fajardo *et al* [27], y método de extracción Soxhlet [28]. Siendo este último, el método utilizado para el desarrollo del presente trabajo.

1.3.2.1 Método de extracción Soxhlet. La extracción Soxhlet, generalmente conocida como extracción sólido-líquido o lixiviación es un método estándar de extracción de muestras sólidas. Esta técnica se usa comúnmente en el laboratorio para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza [29]. El sistema Soxhlet fue inventado por Franz Soxhlet en 1879, y se compone de un matraz, una cámara de extracción (tubo Soxhlet), y un condensador [24].

En este método, el solvente situado en el matraz se calienta hasta alcanzar su temperatura de ebullición, los vapores ascienden por un conducto del tubo Soxhlet y pasan a estado líquido en el condensador ubicado en el tope del extractor, cayendo gota a gota sobre el cartucho que contiene la muestra (al haber contacto solvente-sólido empieza a producirse la transferencia de masa de los analitos hacia el líquido) [30,31]. Cuando el nivel del solvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón, el solvente con los analitos disueltos retorna al matraz [32]. El ciclo vaporización, condensación, extracción y evacuación, se repite varias veces, hasta que se complete el tiempo de extracción, logrando de esta manera someter la muestra a percolación o lavado repetido en el solvente químico [33,34]. En la Figura 1 se puede observar el recorrido de los vapores ascendentes (flechas rojas) y el solvente condensado (flechas azules).

Figura 1. Equipo de extracción Soxhlet



Fuente: Los autores

Terminada la extracción, el matraz que contiene el solvente, extracto lipídico y algunos sólidos residuales (biomasa e impurezas) es llevado a un proceso de

filtración. Seguidamente, se recupera el solvente mediante destilación simple, rotoevaporación o volatilización con el fin de concentrar el extracto en el matraz. Dado que el punto de ebullición del extracto obtenido siempre será superior al del solvente empleado, el solvente destilado no contiene cantidades importantes de éste [30].

Finalmente, el solvente remanente es evaporado hasta que el matraz alcance peso constante, y se calcula el porcentaje de extracto lipídico utilizando la Ecuación 1, donde m_f = masa final del matraz (g), m_i = masa inicial del matraz (g), $m_{muestra}$ = cantidad de muestra inicial (g) y $m_{extracto}$ = cantidad de extracto lipídico obtenido (g) [35].

$$\% \text{ de extracto lipídico} = \frac{m_{extracto}}{m_{muestra}} * 100 = \frac{m_f - m_i}{m_{muestra}} * 100 \quad (1)$$

Una vez calculado el porcentaje de extracto lipídico se determina la eficiencia de la extracción, dada por la relación entre los lípidos extraídos con un determinado método y los que se extraen con un método de control [36]. En consecuencia, la eficiencia se puede obtener mediante la Ecuación 2, donde A_L = porcentaje de extracto lipídico obtenido y A_B = porcentaje total de lípidos en la muestra inicial.

$$Eficiencia = \frac{A_L}{A_B} * 100 \quad (2)$$

1.3.2.2 Variables del proceso de extracción de aceite mediante el método Soxhlet. La eficiencia del proceso de extracción de aceite a partir de microalgas mediante el método Soxhlet depende principalmente de la naturaleza del disolvente y el tiempo de operación.

- **Solventes**

En el caso de extracción de lípidos, los solventes utilizados deben tener una alta solubilidad para todos los compuestos lipídicos, ser lo suficientemente polares para eliminar sus sitios de unión en las membranas celulares, lipoproteínas y

glicolípidos, y ser selectivos [37]. Además para los procesos de extracción son deseables solventes con baja toxicidad e inflamabilidad, baja presión de vapor, baja viscosidad, facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto y bajo costo. El solvente más ampliamente utilizado para extraer aceites vegetales es el hexano, por su solubilidad y facilidad de recuperación [38].

- **Tiempo de extracción**

El tiempo de extracción es otra variable del proceso, que depende del solvente utilizado y del estado en que se prepare la muestra para hacer la extracción [39]. Este tiempo debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés, aunque se debe prestar cuidado para que no sea excesivo. Prolongar el tiempo de extracción más allá del necesario incrementa los costos del consumo de energía y otros costos de operación [40].

1.4 CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE DE MICROALGAS

En las microalgas, los principales componentes de la fracción lipídica son triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos y fosfolípidos [1]. La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) es variable. Los ácidos grasos que van desde C16 a C18 son los más frecuentes, no obstante moléculas de cadena media (C10, C12, C14) o moléculas demasiado largas (> C20) predominan en algunas especies [1,41].

Un perfil de ácidos grasos de cadena larga con un bajo grado de insaturación es deseable para la elaboración de biocombustible de calidad, aunque esto no tiene que ser una limitación, pues el grado de insaturación del aceite de microalgas y su contenido de ácidos grasos con más cuatro dobles enlaces se pueden reducir fácilmente con una hidrogenación parcial catalítica del aceite [3]. Por tanto, el aceite de microalgas puede ser considerado como una alternativa interesante para la producción de biodiesel [1].

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se realiza una descripción detallada de la metodología empleada en el desarrollo experimental, incluyendo los materiales, equipos y etapas necesarias para llevar a cabo el proceso de obtención de aceite de microalgas a nivel de laboratorio mediante la combinación de disrupción celular y extracción Soxhlet.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materia prima

Para la realización del presente trabajo se contó con tres géneros de microalgas: *Amphiprora*, *Desmodesmus* y *Tetraselmis*, las cuales fueron cultivadas en un medio f/2, cosechadas mediante floculación y secadas a exposición solar. Las microalgas fueron suministradas por la Corporación Instituto Morrosquillo (punta Bolívar, Colombia).

Por otra parte, el Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL realizó la caracterización de la biomasa de las microalgas nombradas anteriormente, reportando los datos mostrados en la Tabla 1. El método empleado para la caracterización de la biomasa se describe en el Anexo B.

Tabla 1. Composición química de los géneros de microalgas empleadas

Géneros	Nitrógeno, %	Proteína, %	Cenizas, %	Carbohidratos, %	Lípidos, %
<i>Amphiprora</i>	2,1	13,1	52,8	6,2	12,0
<i>Desmodesmus</i>	7,3	45,9	28,7	6,2	10,9
<i>Tetraselmis</i>	3,0	18,6	46,3	4,9	12,7

Fuente: Informe Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL

2.1.2 Reactivos y equipos

Los reactivos usados durante el proceso fueron hexano, alcohol etílico absoluto anhidro, ciclohexano, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y metanol. Además, durante

el desarrollo del procedimiento se utilizó agua destilada en la preparación de las soluciones y en los procesos de lavado. Las fichas técnicas de los reactivos se muestran en el Anexo C. Igualmente, los equipos empleados durante la experimentación, se especifican en la tabla D1 del Anexo D.

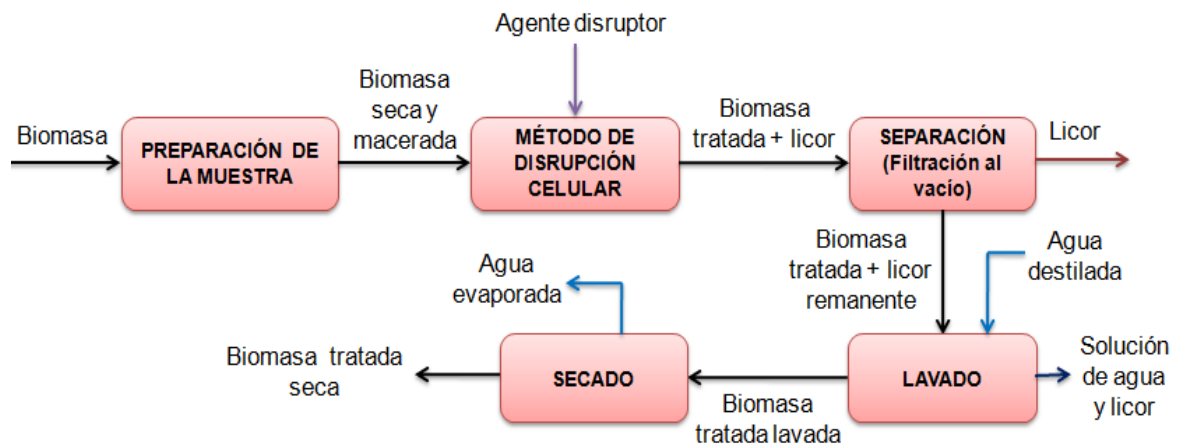
2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El procedimiento experimental se dividió en dos partes, el método de disrupción celular y la extracción Soxhlet.

2.2.1 Método de disrupción celular

Con base en pruebas preliminares se estableció la necesidad de someter la biomasa a un método de disrupción celular antes de realizar el proceso de extracción Soxhlet, el diagrama de bloques para llevar a cabo dicha disrupción se muestra en la Figura 2.

Figura 2. Pasos para aplicar el método de disrupción celular



Fuente: Los autores

El proceso comenzó con la preparación de la muestra, en este primer paso toda la materia prima suministrada se secó en un horno digital de convección a 105°C durante 4 horas con base en la norma NREL/TP-510-42621, y seguidamente fue

macerada; luego, la biomasa se sometió a los diferentes métodos de disrupción celular descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Métodos de disrupción celular evaluados

Métodos de disrupción	Descripción general
Pretratamiento organosolv metanol-H₂SO₄	Se prepara una solución metanol-agua (denominada licor) al 3,32 [%v/v], y se adiciona por cada gramo de biomasa 10 ml de licor. Posteriormente se añade ácido sulfúrico a una concentración de 0,6 [M], y esta mezcla es llevada a un autoclave a 15 psi y 121 °C, con un tiempo de reacción de 247 minutos [42].
Pretratamiento organosolv metanol-HCl	Se prepara una solución metanol-agua (denominada licor) al 3,32 [%v/v], y se adiciona por cada gramo de biomasa 10 ml de licor. Posteriormente se añade ácido clorhídrico a una concentración de 0,5 [M], y esta mezcla es llevada a un autoclave a 15 psi y 121 °C, con un tiempo de reacción de 247 minutos.
HCl 4 [M], 1 min	Por cada 5 gramos de biomasa seca y macerada se añade 50 ml de agua destilada y 2,5 ml de ácido clorhídrico a una concentración de 4 [M]. Finalmente la mezcla se agita por 1 minuto a 500 rpm.
HCl 0,5 [M], 30 min	Se pesan 10 gramos de biomasa seca y se adiciona una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,5 [M] en la proporción 10 ml de solución por cada gramo de biomasa seca. Finalmente se agita la mezcla durante 30 minutos a 500 rpm.

Fuente: Los autores

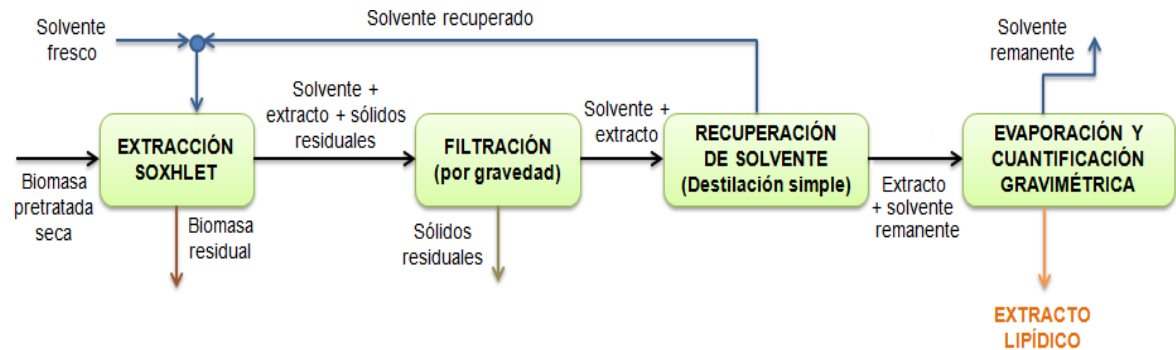
Posteriormente se separó la biomasa tratada de la fase líquida empleando filtración al vacío, y la fase sólida retenida en el filtro fue lavada en tres ocasiones

con 50 ml de agua destilada con el fin de eliminar residuos del agente disruptor, por último, la biomasa se sometió nuevamente a un proceso de secado en un horno a una temperatura de 105°C durante 4 horas. Con esta biomasa tratada seca se realizó el proceso de extracción Soxhlet mediante el cual se evaluó la eficiencia del método de disrupción celular.

2.2.2 Proceso de extracción y cuantificación del extracto

El proceso de extracción y cuantificación del extracto lipídico fue realizado como se observa en la Figura 3.

Figura 3. Diagrama de bloques: Extracción y cuantificación



Fuente: Los autores

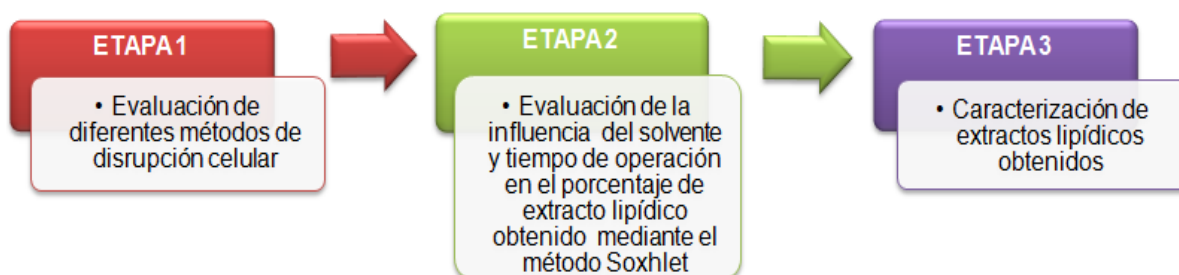
En primera instancia la biomasa pretratada seca se sometió al método de extracción Soxhlet con las condiciones establecidas en la metodología experimental para cada prueba, seguidamente se hizo uso de la filtración por gravedad con el fin de retirar los sólidos residuales (biomasa, impurezas) presentes en la mezcla extracto-solvente. Posteriormente se recuperó el solvente mediante destilación simple obteniendo por una parte el solvente que puede ser reutilizado en posteriores extracciones, y por otra el extracto concentrado. Sin embargo, puesto que con la operación de destilación no se retira todo el solvente, se procedió a evaporar el solvente remanente hasta alcanzar un peso constante en el extracto. Finalmente, la cuantificación del porcentaje de extracto lipídico obtenido se realizó mediante gravimetría por volatilización [43], calculándose el

porcentaje de extracto lipídico junto a la eficiencia del proceso con las Ecuaciones 1 y 2 respectivamente.

2.3 METODOLOGÍA

El desarrollo metodológico se efectuó en tres etapas, las cuales se muestran en la Figura 4, con las dos primeras se buscó seleccionar las mejores condiciones experimentales que permitieran obtener la mayor cantidad de extracto lipídico, y con la tercera etapa determinar el perfil de ácidos grasos presentes en el extracto.

Figura 4. Etapas del desarrollo metodológico



Fuente: Los autores

2.3.1 Etapa 1: Evaluación de diferentes métodos de disrupción celular

Las condiciones a las cuales se realizaron las pruebas experimentales del proceso de extracción durante la primera etapa se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Pruebas realizadas para la elección del método de disrupción

CONDICIONES			
<i>Método de disrupción celular</i>	<i>Género</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Solvente</i>
Sin disrupción (control)	<i>Amphiprora</i>	8 horas	Hexano
Metanol-ácido sulfúrico			
Metanol-ácido clorhídrico			
HCl 4 [M], 1 min			
HCl 0,5 [M], 30 min			

Fuente: Los autores

En estos ensayos se establece el tiempo de extracción en 8 horas puesto que es el valor superior de los tiempos a examinar, y se emplea hexano como solvente

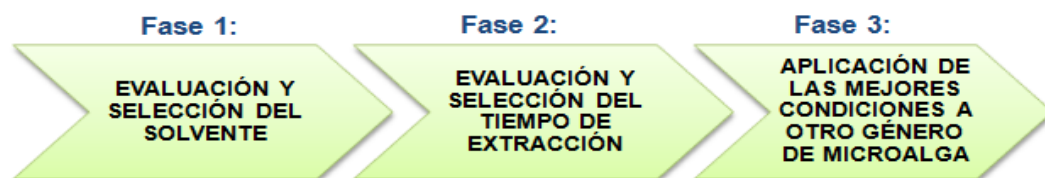
dado que se usa habitualmente en los procesos de extracción [4,44,45]. Igualmente, se efectuaron pruebas de control (sin interrupción), con el fin de evaluar la factibilidad de aplicar un método de interrupción celular antes del proceso de extracción.

Debido a la disponibilidad de biomasa de una misma especie en grandes cantidades, se utilizó el género *Amphiprora* en la evaluación de diferentes métodos de interrupción celular y en la selección del solvente. Mientras que en las pruebas realizadas para la selección del tiempo de extracción se trabajó con *Desmodesmus* sp.

2.3.2 Etapa 2: Evaluación de la influencia del solvente y tiempo de extracción en el porcentaje de extracto lipídico obtenido mediante el método Soxhlet

Hasta el momento no se ha reportado un protocolo en el cual se indique el tiempo de operación y solvente de trabajo que se deben emplear en el método de extracción Soxhlet aplicado a microalgas nativas colombianas, por lo tanto, una vez establecido el mejor tratamiento para la interrupción celular se procedió a evaluar el efecto de estas dos variables en el proceso de extracción Soxhlet siguiendo las fases que se muestran en la Figura 5.

Figura 5. Fases para la evaluación del solvente y tiempo de extracción



Fuente: Los autores

2.3.2.1 Evaluación y selección del solvente. Se analizaron tres solventes reportados ampliamente en la literatura para la extracción de aceite de microalgas, los cuales corresponden al hexano [9,12,24,19], ciclohexano [9,17] y alcohol etílico [24,19,27]. Los solventes postulados fueron escogidos haciendo hincapié en el bajo punto de ebullición, costos, toxicidad y factores de seguridad. En la Tabla 4

se especifican las condiciones a las cuales se realizaron las pruebas correspondientes a la evaluación y selección del solvente (fase 1).

Tabla 4. Pruebas realizadas para la determinación del solvente

CONDICIONES			
<i>Método de disrupción celular</i>	<i>Género</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Solvente</i>
Mejor método definido según los resultados obtenidos en la etapa 1	<i>Amphiprora</i>	8 horas	Hexano
			Ciclohexano
			Alcohol etílico

Fuente: Los autores

2.3.2.2 Evaluación y selección del tiempo de extracción. Con base en revisión bibliográfica se observó que generalmente los tiempos de 4 y 8 horas [46,47,48] eran empleados en procesos de extracción de aceite a partir microalgas mediante el método Soxhlet, por lo tanto en el presente trabajo se escogen tiempos de 4, 8 horas, y un valor intermedio (6 horas) con el fin de evaluar la influencia de esta variable en el porcentaje de extracto lipídico. En la Tabla 5 se muestran las condiciones correspondientes para la evaluación y selección del tiempo de extracción (fase 2).

Tabla 5. Pruebas realizadas para la selección del tiempo de extracción

CONDICIONES			
<i>Método de disrupción celular</i>	<i>Género</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Solvente</i>
Sin disrupción (control)	<i>Desmodesmus</i>	4 horas	Solvente seleccionado en la fase 1
		6 horas	
		8 horas	
Mejor método definido según la etapa 1		4 horas	
		6 horas	
		8 horas	

Fuente: Los autores

2.3.2.3 Aplicación de las mejores condiciones a otro género de microalga. Por último con las mejores condiciones seleccionadas se realizaron pruebas con el género *Tetraselmis*. En la Tabla 6 se muestran las condiciones empleadas en esta tercera fase.

Tabla 6. Pruebas con el género *Tetraselmis*

CONDICIONES			
<i>Métodos de disrupción celular</i>	<i>Género</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Solvente</i>
Sin disrupción (control)	<i>Tetraselmis</i>	Tiempo seleccionado en la fase 2	Solvente elegido en la fase 1
Mejor método definido según la etapa 1			

Fuente: Los autores

Durante este desarrollo metodológico en la parte correspondiente a la extracción Soxhlet la cantidad de biomasa (5 gramos) y la relación biomasa/solvente (1:60) se mantuvo constante. Además, todas las pruebas durante las dos primeras etapas fueron realizadas por triplicado con el fin de obtener resultados estadísticamente significativos.

2.3.3 Etapa 3: Caracterización de los extractos lipídicos obtenidos

Los extractos obtenidos del proceso de extracción Soxhlet fueron guardados en recipientes herméticamente cerrados para la posterior caracterización por parte del Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL.

La determinación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases en un cromatógrafo Agilent 7890 con columna DB5-HT de 15 metros y detector FID (detector de ionización de la llama).

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

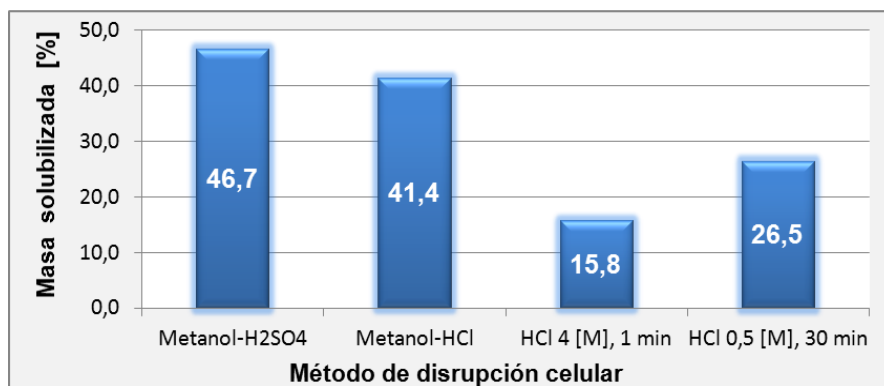
En este capítulo se analiza la influencia de algunas variables involucradas en el proceso de extracción (método de disrupción celular, solvente y tiempo de operación) en el porcentaje de extracto lipídico, con el fin de establecer las condiciones experimentales recomendadas para posteriores estudios. Igualmente se presentan los resultados de la caracterización de algunos de los extractos obtenidos.

3.1 MÉTODO DE DISRUPCIÓN CELULAR

3.1.1 Porcentaje de masa solubilizada

Cada método de disrupción afecta en diferente medida los componentes químicos presentes en la pared celular de las microalgas, reduciendo la cantidad de biomasa utilizada en el pretratamiento y por ende la materia prima disponible para la extracción. En consecuencia es importante determinar la cantidad de masa solubilizada durante esta etapa del proceso. En relación al aspecto mencionado, se obtuvieron los resultados con el género *Amphiprora* que se muestran en la Figura 6.

Figura 6. Masa solubilizada [%] de acuerdo al método de disrupción celular



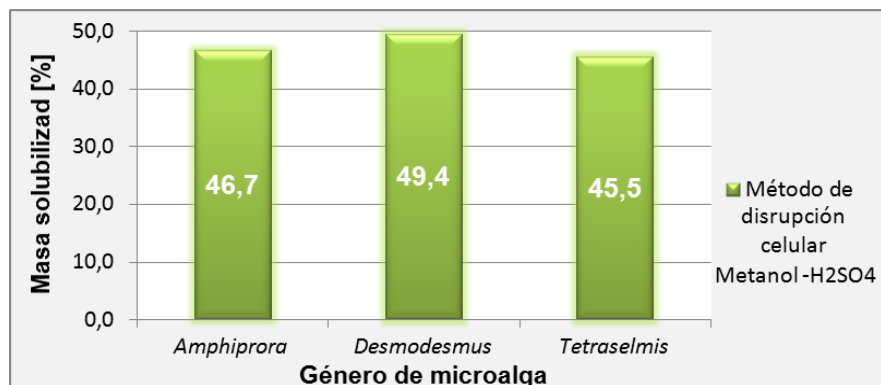
Fuente: Los autores

Como se puede observar, el método de disrupción celular que presentó mayor porcentaje de masa solubilizada fue metanol-H₂SO₄ (46,7%). Además, al

comparar los resultados de los métodos de disrupción metanol-H₂SO₄ y metanol-HCl con HCl 4 [M] 1 min y HCl 0,5 [M] 30 min los primeros presentaron un mayor porcentaje de masa solubilizada lo cual puede atribuirse a un tiempo de contacto superior (247 min) entre el agente disruptor y la biomasa, y a una mayor temperatura de operación. Por otro lado, los métodos en los cuales se presentan las mismas condiciones de operación pero que difieren en el ácido empleado presentaron resultados cercanos; metanol-H₂SO₄ 46,7% y metanol-HCl 41,4%.

En relación a los tres géneros de microalga utilizados y aplicando un mismo método de disrupción celular (metanol-H₂SO₄), en la Figura 7 se observa que la cepa *Desmodesmus* sp. presenta mayor porcentaje de masa solubilizada (49,4%) comparada con *Amphiprora* sp. (46,7%) y *Tetraselmis* sp. (45,5%), sin embargo, las diferencias en los porcentajes no son significativas, y las pequeñas variaciones se pueden atribuir a la composición y estructura de la pared celular que difiere de un género a otro. Por ejemplo, la pared celular del grupo de las diatomeas al cual corresponde el género *Amphiprora* está constituida por dos mitades (semitecas) compuestas principalmente de sílice hidratada y proteínas, esta sílice le proporciona dureza y alta resistencia a la acción de ácidos y bases fuertes. Mientras que la pared celular de las algas verdes a la cual pertenecen los géneros *Desmodesmus* y *Tetraselmis* es una estructura sencilla compuesta en su mayoría por celulosa, siendo más débil en comparación con la pared de las diatomeas.

Figura 7. Masa solubilizada [%] de acuerdo al género de microalga

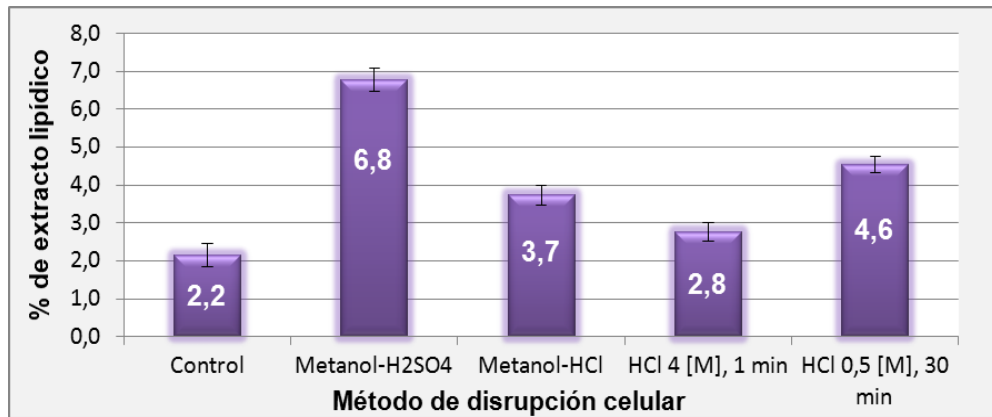


Fuente: Los autores

3.1.2 Influencia del método de disrupción en el porcentaje de extracción

En la Figura 8 se muestra el porcentaje de extracción obtenido para cada método de disrupción celular empleando el género *Amphiprora*. Como se puede observar el pretratamiento organosolv metanol-H₂SO₄ aumenta tres veces el porcentaje de extracto lipídico obtenido con el control, además, es el que ofrece el mejor resultado (6,8%) en comparación con los demás métodos realizados. Esta diferencia se puede presentar por el grado de disolución de los componentes de la pared celular de la microalga de acuerdo a cada agente disruptor y las condiciones de operación del tratamiento, permitiendo que los lípidos estén expuestos en mayor o menor medida al solvente de extracción, lo cual incide en el porcentaje de extracto lipídico obtenido.

Figura 8. Porcentaje de extracto lipídico obtenido al variar el método de disrupción



Fuente: Los autores

Igualmente, con los datos obtenidos se puede corroborar que aunque el tiempo de operación del método de disrupción sea corto (1 min), la presencia de un agente disruptor (por ejemplo ácido) incrementa el porcentaje de extracto lipídico, esto indica que el simple hecho de someter la microalga a un proceso de disrupción celular, mejora la eficacia de la extracción.

Además en la Figura 8 se muestra que los dos métodos en los cuales se utilizan las mismas condiciones de operación y que solo difieren en la naturaleza del ácido empleado presentan diferencias notables en los resultados obtenidos; metanol-

H₂SO₄ 6,8% y metanol-HCl 3,7%. Este comportamiento se puede atribuir a la naturaleza del ácido utilizado y su interacción con el metanol en la solución.

De los resultados obtenidos, también se aprecia que el método de disrupción HCl 0,5 [M] 30 min es el procedimiento con el cual se obtiene el segundo valor más alto de porcentaje de extracto lipídico (4,6%). Este método no tiene un requerimiento energético adicional aparte de la agitación magnética, posee mayor facilidad de aplicación y menor tiempo de operación (30 min), en comparación con el método metanol-H₂SO₄ (autoclave 15 psi a 121 °C, y 247 minutos). Sin embargo para el presente trabajo se elige el mejor método de disrupción celular (metanol-H₂SO₄) desde el punto de vista del extracto, aunque para efecto de escalado se recomienda examinar y tener en cuenta el método HCl 0,5 [M] 30 min.

En la Tabla 7 se reporta la eficiencia del proceso de extracción de acuerdo al método de disrupción aplicado, observándose que al utilizar el método de disrupción celular metanol-H₂SO₄ se aumenta significativamente la eficiencia del proceso, pasando del 18% (control) al 56%, logrando así con uno de los objetivos propuestos en el proyecto Bioprospección de microalgas colombianas con potencial para la producción de biodiesel el cual indica la necesidad de extraer al menos el 50% del aceite contenido en las microalgas.

Tabla 7. Eficiencia de la extracción con relación al método de disrupción empleado

MÉTODOS DE DISRUPCIÓN	EFICIENCIA (%)	Desviación estándar
Control	18,0	2,4947
Metanol-H₂SO₄	56,5	2,5495
Metanol-HCl	31,1	2,1928
HCl 4 [M], 1 min	23,0	1,9918
HCl 0,5 [M], 30 min	37,9	1,7802

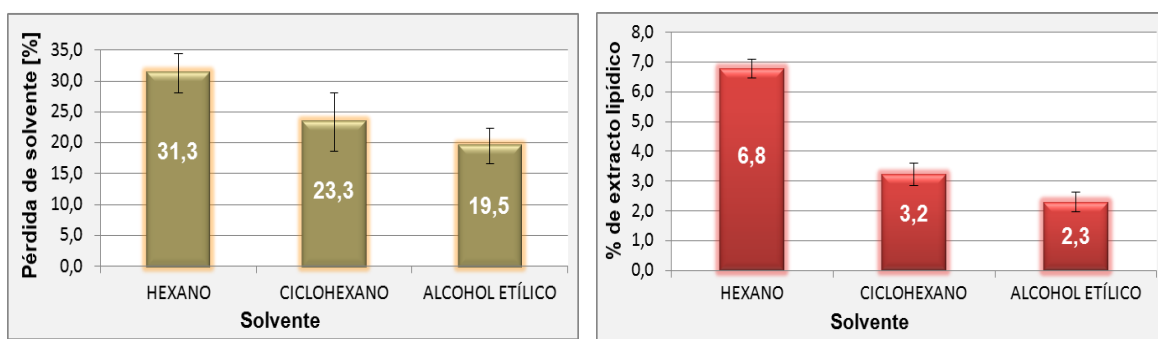
Fuente: Los autores

Cabe aclarar que el valor del porcentaje total de lípidos en la biomasa inicial necesario para calcular la eficiencia se tomó de los datos suministrados por el Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL.

3.2 SELECCIÓN DEL SOLVENTE DE TRABAJO

De los tres solventes usados en este trabajo, el hexano presenta una mayor pérdida de solvente (31,3%) como se observa en la Figura 9a, este comportamiento es debido a que posee una mayor presión de vapor en comparación con los otros dos, evaporándose más fácilmente. Sin embargo, como se evidencia en la Figura 9b utilizando hexano como solvente de trabajo, se obtiene el mayor porcentaje de extracto lipídico (6,8%) en relación con el ciclohexano (3,2%) y el alcohol etílico (2,3%). Además, es el más económico de los tres solventes analizados, selectivo hacia los lípidos neutros y habitualmente empleado en los procesos de extracción con solventes químicos.

Figura 9. Selección del solvente a) Pérdida de solvente [%] durante el proceso de extracción y b) Porcentaje de extracto lipídico obtenido variando el solvente



Fuente: Los autores

En relación con los otros dos solventes, al realizar la extracción con ciclohexano se obtuvo el segundo valor más alto de porcentaje de extracto lipídico (3,2%), sin embargo es el más costoso de los tres solventes. Por su parte, el alcohol etílico si bien es un buen solvente de extracción, su selectividad hacia los lípidos es relativamente baja comparada con el hexano y ciclohexano, y es necesario realizar un proceso de depuración (por ejemplo tratar el extracto crudo con solventes apolares) para obtener el extracto lipídico, pues por simple inspección se observa presencia de biomasa y componentes tales como pigmentos. Logrando el menor porcentaje de extracto lipídico (2,3%) con este solvente.

Respecto a la eficiencia obtenida con los tres solventes analizados, el hexano es el más efectivo alcanzando una eficiencia del 56,5% como se aprecia en la Tabla 8, además es el que tiene mayor reproducibilidad de los datos en comparación con el ciclohexano y alcohol etílico de acuerdo a la desviación estándar calculada.

Tabla 8. Eficiencia del proceso de extracción en relación al solvente de trabajo

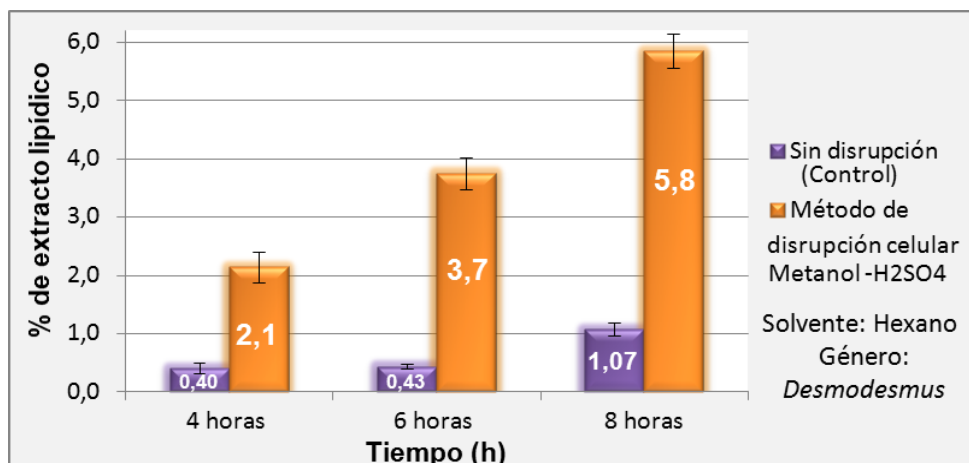
SOLVENTES	EFICIENCIA (%)	Desviación estándar
HEXANO	56,5	2,5495
CICLOHEXANO	26,9	3,0353
ALCOHOL ETÍLICO	19,3	2,7426

Fuente: Los autores

3.3 ELECCIÓN DEL TIEMPO DE OPERACIÓN

Como se observa claramente en la Figura 10, al aumentar el tiempo de contacto entre las dos fases (sólido-líquido) se incide de manera considerable en el aumento del porcentaje de extracción, puesto que se favorece la transferencia de masa de los componentes lipídicos hacia el solvente (líquido), alcanzándose un mayor porcentaje de extracto lipídico (5,8%) al someter la muestra a un tiempo de 8 horas y con tendencia al incremento para tiempos superiores.

Figura 10. Porcentaje de extracto lipídico al variar el tiempo de extracción



Fuente: Los autores

Igualmente, en la Figura 10 se aprecia que al duplicar el tiempo de extracción y empleando el método de disrupción metanol-H₂SO₄ aumenta aproximadamente tres veces el porcentaje de extracto lipídico, pasando de 2,1% con 4 horas a 5,8% con 8 horas. Del mismo modo al comparar los resultados obtenidos con y sin disrupción, se evidenció un aumento en más de cinco veces en el porcentaje de extracción, para todos los tiempos.

En la Tabla 9 puede verse la variación de la eficiencia del proceso de extracción respecto al tiempo de operación al emplear hexano como solvente, logrando un mejor resultado (53,6%) para un tiempo de 8 horas.

Tabla 9. Eficiencia de la extracción con relación al tiempo de operación

MÉTODO DE DISRUPCIÓN CELULAR	TIEMPO DE EXTRACCIÓN (h)	EFICIENCIA (%)	Desviación estándar
Biomasa sin disrupción (control)	4	3,7	0,8325
	6	3,9	0,3648
	8	9,8	0,9874
Biomasa con pretratamiento organosolv Metanol-H ₂ SO ₄	4	19,6	2,3862
	6	34,3	2,5732
	8	53,6	2,7439

Fuente: Los autores

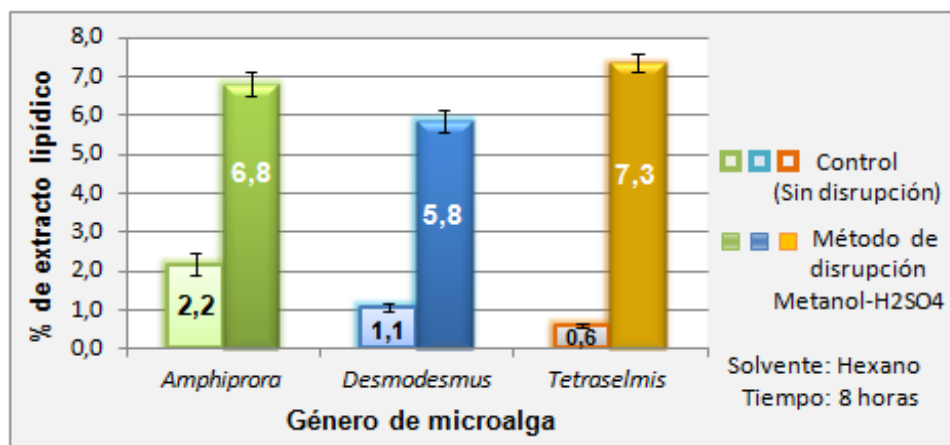
3.4 MEJORES CONDICIONES EXPERIMENTALES OBTENIDAS

Tomando las condiciones con las cuales se obtuvo el mayor porcentaje de extracto lipídico, método de disrupción metanol-H₂SO₄, solvente hexano y 8 horas de operación, se realizó la extracción de aceite para los géneros *Amphiprora*, *Desmodesmus* y *Tetraselmis*, obteniendo los datos mostrados en la Figura 11.

Respecto a los diferentes géneros de microalgas empleados no se puede hacer una comparación de los porcentajes de extracción debido a que el contenido de lípidos varía de acuerdo al género, no obstante, al observar la Figura 11 se hace evidente de nuevo la ventaja de aplicar un método de disrupción celular antes del proceso de extracción, siendo en este aspecto más promisoría la cepa *Tetraselmis*

sp., la cual tuvo un incremento de doce veces el porcentaje de extracto lipídico obtenido en relación a la biomasa sin pretratar.

Figura 11. Resultados obtenidos con las mejores condiciones para los tres géneros de microalgas



Fuente: Los autores

Además, en la tabla 10 se muestra que para todos los géneros de microalgas se obtuvo una eficiencia del proceso superior al 50% empleando las mejores condiciones de las variables analizadas, alcanzando uno de los objetivos planteados en el marco del proyecto Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel (extraer al menos el 50% del aceite contenido en las microalgas), al cual pertenece el presente trabajo.

Tabla 10. Eficiencia del proceso de extracción con las mejores condiciones

Condiciones	Género	Eficiencia (%)	Desviación estándar
Biomasa con pretratamiento organosolv metanol-H ₂ SO ₄ , solvente hexano, 8 horas	<i>Amphiprora</i>	56,5	2,5495
	<i>Desmodesmus</i>	53,6	2,7439
	<i>Tetraselmis</i>	57,6	1,8656

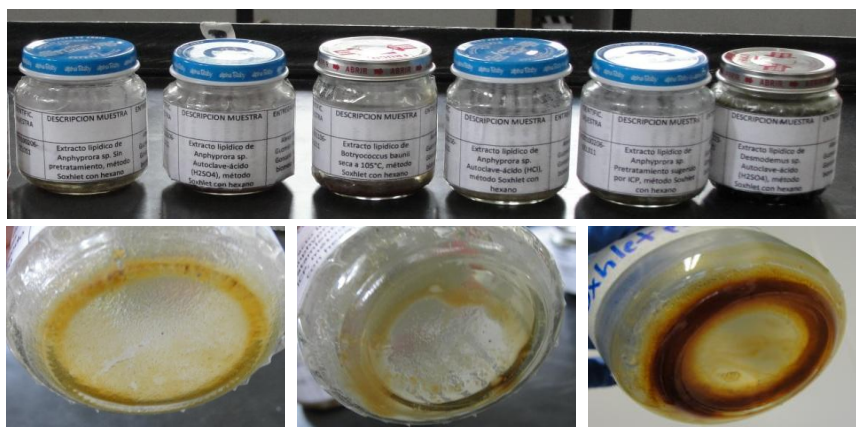
Fuente: Los autores

En el Anexo E se hace una descripción detallada del procedimiento experimental con el cual se obtienen los mejores resultados respecto al porcentaje de extracto lipídico.

3.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Si bien es fundamental conocer el porcentaje de extracto lipídico obtenido con las condiciones experimentales probadas, es también importante conocer el perfil de ácidos grasos presentes en el extracto, pues no todos los componentes que resultan del proceso de extracción son útiles a la hora de aprovechar el aceite de microalgas en la producción de biodiesel. En la Figura 12 se observan algunos de los extractos lipídicos obtenidos durante el desarrollo de las pruebas experimentales.

Figura 12. Algunos extractos lipídicos obtenidos en las pruebas realizadas



Fuente: Los autores

El perfil de ácidos grasos de algunos extractos se muestra en el Anexo F. Sin embargo de manera general en la tabla 11 se presenta un resumen de los principales resultados obtenidos para algunas de las especies sometidas a extracción. Los datos reportados en esta tabla corresponden a porcentajes en área de los diferentes ácidos grasos detectados en las muestras tomadas de los extractos lipídicos. Estos porcentajes en área son muy similares a la composición real de ácidos grasos y por tanto se pueden aproximar. Por otro lado, el porcentaje de área de los acilglicerol (tabla 11 y 12) varía con respecto a la relación másica, siendo por tanto el valor mostrado en la tabla una estimación de la cantidad de acilglicerol presentes en el extracto.

Tabla 11. Principales ácidos grasos del aceite de microalgas

ÁCIDOS GRASOS (%)	<i>Desmodemus</i> , control, hexano, 8 h	<i>Desmodemus</i> , metanol-H ₂ SO ₄ hexano, 8 h	<i>Amphiprora</i> , control, hexano, 8 h	<i>Amphiprora</i> , HCl 4 [M] 1 min, hexano, 8h	<i>Amphiprora</i> , metanol-H ₂ SO ₄ , hexano, 8 h	<i>Amphiprora</i> , metanol-HCl, hexano, 8 h
SATURADOS (Decanoico, Undecanoico, Láurico, Tridecanoico, Mirístico, Pentadecanoico, Palmítico, Esteárico, Heptadecanoico, Araquídico)						
Total de los principales ácidos grasos saturados	7,4	48,3	24,1	22,6	27,3	21,4
INSATURADOS						
Mono-insaturados (Miristoleico, Pentadecenoico, Palmitoleico, Oleico, Elaidico, Eicosapentanoico)						
Total de los principales ácidos grasos mono-insaturados	3,7	16,6	11,4	12,6	14,3	14,5
Di-insaturados (Linoeladico, Linoleico, Eicosanodioico, Docosadienoico)						
Total de los principales ácidos grasos di-insaturados	86,0	29,8	54,5	46,2	41,7	47,8
Tri-insaturados (Gama-Linolénico, Linolénico, Eicosatrienoico)						
Total de los principales ácidos grasos tri-insaturados	0,6	1,4	4,6	8,0	2,1	3,5
Total de los principales ácidos grasos insaturados	90,3	47,8	70,5	66,8	58,1	65,8
Otros ácidos grasos (saturados e insaturados)	2,3	3,9	5,4	10,6	14,6	12,8
Acilgliceroles (% área)	28,9	24,7	7,5	7,4	6,5	7,1

Fuente: Datos tomados del informe de caracterización Instituto Colombiano del Petróleo

En la tabla 11 se puede observar que los extractos lipídicos obtenidos al emplear un pretratamiento presentan mayor porcentaje de ácidos grasos saturados en comparación con las pruebas de control, logrando mejores resultados los extractos de la biomasa tratada con el método de disrupción metanol-H₂SO₄. Este aspecto es favorable en la producción de biodiesel donde se prefieren ácidos grasos de bajo grado de insaturación, con el fin de evitar problemas de oxidación durante el almacenamiento del biocombustible.

Por otro lado, al comparar si un aceite es mejor que otro para producir biodiesel se debe tener en cuenta el contenido de acilgliceroles, pues son estos los que participan en la reacción de transesterificación. De los resultados mostrados en la tabla 12, para ambos géneros de microalga (*Amphiprora* y *Desmodesmus*), se puede estimar un mayor porcentaje de acilgliceroles en los extractos obtenidos con pruebas en las cuales se utilizó un método de disrupción en comparación con las pruebas de control (sin disrupción). Logrando una mayor cantidad estima de acilgliceroles al utilizar el método de disrupción celular que presentó mejores resultados respecto al porcentaje de extracto lipídico (metanol-H₂SO₄). Por lo cual, en términos generales, la disrupción celular resulta más favorable para la extracción de lípidos utilizados en la elaboración de biodiesel, pues la cantidad total de acilgliceroles es mayor teniendo en cuenta la totalidad del extracto obtenido.

Tabla 12. Cantidad estimada de acilgliceroles

Descripción del extracto lipídico	Cantidad de extracto obtenido (g)	Acilgliceroles (% área) en la muestra	Cantidad total estima de acilgliceroles (g)
<i>Desmodesmus</i> , control, hexano, 8 h	0,0539	28,9	0,0156
<i>Desmodesmus</i> , metanol-H ₂ SO ₄ , hexano, 8 h	0,4413	24,7	0,1090
<i>Amphiprora</i> , control, hexano, 8 h	0,1090	7,5	0,0082
<i>Amphiprora</i> , HCl 4[M] 1 min, hexano, 8 h	0,1614	7,4	0,0119
<i>Amphiprora</i> , metanol-H ₂ SO ₄ , hexano, 8 h	0,5024	6,5	0,0327
<i>Amphiprora</i> , metanol-HCl, hexano, 8 h	0,2672	7,1	0,0190

Fuente: Los autores

Además se permite aclarar que debido a no contar con los resultados de la caracterización realizada al extracto lipídico obtenido del género *Tetraselmis*, el perfil de ácidos grasos no fue incluido en el presente trabajo.

4. CONCLUSIONES

- Se estableció un conjunto de condiciones experimentales favorables para la obtención de aceite de microalgas nativas a nivel de laboratorio combinando disrupción celular y método de extracción Soxhlet.
- La incorporación de una etapa de disrupción celular antes de la extracción aumenta la eficiencia del proceso de obtención de aceite a partir de microalgas mediante la extracción Soxhlet, siendo el método de disrupción celular metanol-H₂SO₄ (56,5%) el más eficiente de los evaluados.
- En la extracción Soxhlet aplicada a microalgas se obtiene un mayor porcentaje de extracto lipídico al utilizar hexano (6,8%) como solvente y un tiempo de operación de 8 horas (5,8%), favoreciendo significativamente de esta manera la eficiencia del proceso (56,5% y 53,6% respectivamente).
- Con las mejores condiciones de las variables analizadas (pretratamiento metanol-H₂SO₄, solvente hexano, y 8 horas de operación) se obtuvo una eficiencia del proceso superior al 50% para los tres géneros de microalga utilizados (*Amphiprora*: 56,5%; *Desmodesmus*: 53,6% y *Tetraselmis*: 57,6%), logrando así uno de los objetivos propuestos en el presente trabajo y en el proyecto global Bioprospección de microalgas colombianas con potencial para la producción de biodiesel.
- Los extractos lipídicos obtenidos después de realizar una disrupción celular en comparación con los extractos sin disrupción, presentan una composición de ácidos grasos más favorable para la producción de biodiesel, pues la cantidad estimada de acilgliceroles es mayor teniendo en cuenta la cantidad total del extracto obtenido.

5. RECOMENDACIONES

En posteriores trabajos se recomienda ensayar tiempos de extracción superiores a 8 horas, con el fin de establecer si este aumento permite incrementar la eficiencia de la extracción. Sin embargo, se debe tener presente que a mayor tiempo de operación se aumentan los costos relacionados con el consumo de energía y de solvente.

Realizar un análisis energético y exergético del proceso de extracción multietapas en flujo cruzado (simulado a nivel laboratorio mediante el método de extracción Soxhlet) con el fin de evaluar si este procedimiento es viable energéticamente.

Aprovechar los efluentes del proceso de ruptura celular y extracción de aceite a partir de microalgas para la obtención de otros productos de valor agregado aplicando el concepto de biorefinería.

Aplicar técnicas adicionales de caracterización a los extractos lipídicos con el fin de identificar los componentes del extracto diferentes a los acilglicerolos que aparecen en los cromatogramas y generan ruido en estos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] GARIBAY, Adriana; VÁZQUEZ, Rafael; SÁNCHEZ, M. del Pilar; *et al.* Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*, 2009, vol. 13 N°3, p. 38-60.
- [2] SHAHZAD, Irim, HUSSAIN; Khalid; *et al.* Algae as an alternative and renewable resource for biofuel production. *The Biol, E-Journal of Life Sciences*, 2010, vol. 1 N°1, p 16-23.
- [3] MENG, Xin; YANG, Jianming; XU, Xin; *et al.* Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 2009, vol. 34 N°1, p. 1-5.
- [4] MIAO, Xiaoling y WU, Qingyu. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 2006, vol. 97 N° 6, p. 841–846.
- [5] CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, May-Jun 2007, vol. 25 N° 3, p.294-306.
- [6] BENEMANN, John; SHEEHAN, John; DUNAHAY, Terri Paul; *et al.* A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from Algae. National Renewable Energy Laboratory, 1998. 328p.
- [7] ALBARRACÍN, Isabel. Microalgas: potenciales productoras de biodiesel. XV simposio electrónico internacional la producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad, Argentina 2007. 16p.
- [8] CASTRO, Claudia; VALVERDE, María y PAREDES, Octavio. Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *Revista Ide@s CONCYTEG*, diciembre, 2009, Año 4 N° 54, p.1246-1270.
- [9] ANDERSON, Jordan y SOREK, Benjamin. Microalgae: the fuel of tomorrow. Ninth annual freshman conference, University of Pittsburgh, 2009, 7 p.

- [10] MATA, Teresa; MARTINS, Antonio; CAETANO, Nidia. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, vol. 14 N° 1, p. 217–232.
- [11] BENEZRA, Claudia. Extracción y cuantificación máxima de proteínas de la microalga marina, *Isochrysis* sp. Trabajo de grado Químico Biólogo. México: Universidad de Sonora. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, 1995. 56p.
- [12] HERNÁNDEZ, Efraín; MARTÍNEZ, Alfredo de Jesús y CAÑIZARES Rosa. Contenido de lípidos de dos especies diferentes del género *Scenedesmus* para la eventual producción de bioenergéticos. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, junio, 2009, Acapulco, México.
- [13] PRIETO, Martha; MOGOLLON, Martha; ADA, Castro; *et al.* Efecto del medio y condiciones de cultivo en la productividad de tres diatomeas marinas con potencial acuícola. *Revista MVZ Córdoba* [en línea], 2005, vol. 10 N°001, p. 544- 554. [Fecha de consulta: 19 de junio de 2010], Disponible en: <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=69310104>>
- [14] LÜRLING, M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. Université Paul Sabatier, Francia, 2003, vol. 39, N°2, p 85-101
- [15] CAMBEFORT, Santiago. Efecto de las microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis* sp. e *Isochrysis galbana* sobre la reproducción y desarrollo naupliar en copépodos calanoideos marinos tropicales, *Acartia* spp. Trabajo de grado Ingeniero en Acuicultura. Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, 2009. 81p.
- [16] ARROYO, Laura y BALDENEbro, Francisco. Producción de biomasa y composición química de dos especies de microalgas marinas a diferentes salinidades. Trabajo de grado químico biólogo. México: Universidad de Sonora.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, 1994. 78p.

[17] BARRAZA, Camila; COLLAO, Vanessa; *et al.* Producción de biodiesel a partir de microalgas. Chile: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Bioquímica, 2009. 26p.

[18] AULLON, Anna. Biodiesel from Microalgae. Royal. School of Technology Kungliga Tekniska Högskolan, 2010. 92 p.

[19] RICHMOND, Amos. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Wiley-Blackwell Publishing, 2004. p. 230-235.

[20] HENRIQUES, M; SILVA, A y ROCHA, J. 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, 2: 586-593.

[21] LEE, Jae-Yon; YOO, Chan; JUN, So-Young; *et al.* Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Bioresource Technology, 2020, vol. 101 N°1, Supplement 1, p. S75-S77

[22] MENDES-PINTO, M; RAPOSO, M; *et al.* 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, 2001, vol. 13 N°1, p. 19–24.

[23] MOLINA-GRIMA, E; ACIÉN-FERNÁNDEZ F.G; ROBLES-MEDINA, A; *et al.* Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances, 2003, vol. 20 N° 7-8, p. 491–515.

[24] GONZÁLEZ, Angel; KAFAROV, Viatcheslav y GUZMÁN, Alexander. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. Prospect, 2009, vol. 7, N° 2, p. 53-60.

- [25] BLIGH, EG. y DYER, WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, 1959, vol. 37 N° 8, p. 911-917.
- [26] FOLCH, Jordi; *et al.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, vol. 226 N° 1, p. 497-509.
- [27] RAMÍREZ-FAJARDO, Antonio; CERDÁN, Luis; ROBLES-MEDINA, Alfonso; *et al.* Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2007, vol. 109 N°2, p.120-126.
- [28] SOXHLET, Franz. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes, *Dinglers Polytechnisches Journal*, 1879, vol. 232, p 461-465
- [29] ALVA, Marco. Determinación del contenido graso de leche en polvo: extracción Soxhlet. En: Guía de Prácticas de Bromatología. 2da. Edición. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Perú: Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, 2010. p. 23-27.
- [30] SOGORB, Miguel y VILLAVONA, Eugenio. Extracción Soxhlet. En: Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias. España: Ediciones Díaz de Santos S.A, 2004. p. 20-22
- [31] GARCÍA Alberto; GARCÍA, Miguel A; *et al.* Recuperación de cera de cutícula de caña de azúcar mediante separación mecánica y extracción con solventes. *Grasas y Aceites*, 2003, vol. 54 N°2, p. 169-174.
- [32] LUQUE DE CASTRO, M y PRIEGO, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 1217 N°16, p. 2383–2389.

- [33] BLUM-FRETZ, Claudia; BAUMANN, Andreas, y FEIFEL, Susanne. Fat determination: comparison between Soxhlet and Hot Extraction. BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland, 2007, 47:1-8.
- [34] OCAMPO, Rogelio; RÍOS, Luz; *et al.* Curso práctico de química orgánica. Primera edición. Editorial Universidad de Caldas, 2008. p. 61-64
- [35] AOAC, Official Method 963.15, Fat in cacao products, Soxhlet extraction method, 2006.
- [36] MOLINA, E; ROBLES, A; GIMÉNEZ, A; *et al.* Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1994, vol. 71 N° 9, p. 955-959.
- [37] MANIRAKIZA, P; COVACI, A y SCHEPENS, P. Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. Journal of food composition and analysis, 2001, vol. 14 N°1, p. 93-100.
- [38] VELASCO, Reinaldo; VILLADA, Héctor y CARRERA, Jorge. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. Revista Información Tecnológica, Alimentos y Biotecnología, 2007, vol.18 N°1, p 53 – 66.
- [39] GUERRERO, Jorge y SANABRIA, Jaime. Extracción y refinación del aceite de higuera. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química, 1975. 139 p.
- [40] SHARAPIN, Nikolai. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello, Cooperación Iberoamericana CYTED, Subprograma X Química Fina Farmacéutica, Ministerio de Educación y Cultura de España. Primera edición, 2000, 247 p.

- [41] HU, Qiang, SOMMERFELD, Milton Sommerfeld; *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 2008, vol. 54 N° 4, p. 621- 639.
- [42] MEZA, Paola y SEPÚLVEDA, Astrid. Estudio del pretratamiento metanol-ácido de la microalga *Chaetoceros gracilis* para la obtención de azúcares reductores totales. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química, 2010. 50p.
- [43] SKOOG, Douglas y WEST, Donald. Introducción al análisis gravimétrico. En: Introducción a la química analítica. Cuarta edición. Sevilla: Editorial Reverté S.A, 2002. p. 67- 73.
- [43] MANI, Sudhagar; JAYA, Shankar y VADIVAMBAL, Rajagopal. Optimization of solvent extraction of moringa (*Moringa oleifera*) seed kernel oil using response surface methodology. *Trans IChemE*, 2007, vol. 85 N° 4, p. 328-335.
- [45] ARYEE, Alberta y SIMPSON, Benjamin. Comparative studies on the yield and quality of solvent-extracted oil from salmon skin. *Journal of Food Engineering*, 2009, vol. 92 N° 3, p. 353–358.
- [46] MACEIRAS, R; CANCELA, A; *et al.* An Innovative Biodiesel Production. *The Italian Association of Chemical Engineering*, 2009. 6p.
- [47] G. ANDRICH, G; ZINNAI, A; *et al.* Supercritical fluid extraction of oil from microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Acta Alimentaria*, 2006, vol. 35 N°2, p 195–203.
- [48] ERAKIN, Sinem y CEMAL, Kasım. The Volatile Petroleum Hydrocarbons in Marine Algae Around Turkish Coasts. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 2007, vol. 50 p. 167-182

ANEXOS

ANEXO A: CONTENIDO LIPÍDICO DE ALGUNAS ESPECIES DE MICROALGAS

El contenido de lípidos en las microalgas varía principalmente de acuerdo con las diferentes especies y las condiciones de cultivo (como la temperatura, pH, tiempo de cultivo, etc). Sin embargo, los lípidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 40% de su peso seco, aunque se han reportado valores en un rango del 1 al 70%, o incluso superiores, como se señala en la Tabla A1. Comúnmente Las especies que producen más de un 30% de materias grasas se denominan “oleaginosas”.

Tabla A1. Contenido lipídico de algunas microalgas

Microalga	Contenido de aceite (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

Fuente: CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, May-Jun 2007, vol. 25 N° 3, p.294-306.

ANEXO B: MÉTODO EMPLEADO POR EL INSTITUTO COLOMBIANO DEL PETRÓLEO ICP-ECOPETROL PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

El mismo procedimiento que se describe a continuación fue realizado para los diversos géneros de microalgas suministrados por el Instituto Morrosquillo (punta Bolívar, Colombia).

Debido a la dificultad que presentan algunos métodos de determinación de grasa, proteínas y carbohidratos en la biomasa de microalgas, y lo demorados de los mismos, el ICP inicia a evaluar técnicas espectroscópicas no destructivas para determinación rápida del contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas en células (biomasa), que sirvan de apoyo para la identificación de cepas con mayor potencial productor de aceite.

Las técnicas identificadas para la cuantificación rápida del contenido de lípidos en biomasa de microalgas, que podría aplicar el ICP con los equipos disponibles, son la espectroscopía de infrarrojo medio o MIR, la espectroscopía de infrarrojo cercano o NIR y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear o RMN. Por ahora se inició evaluando si es posible correlacionar algunas características de los espectros infrarrojos con el análisis proximal de la biomasa de microalgas. Para ello se prepararon diferentes mezclas de microalgas, carbohidratos, proteínas y lípidos, en proporciones diferentes y se midieron los espectros infrarrojos por la técnica de IR-ATR y por transmitancia. En la Tabla B1 se presentan las mezclas preparadas y los análisis efectuados.

Tabla B1. Mezcla de microalgas, lípidos, carbohidratos y proteínas usadas para evaluar la factibilidad de la determinación indirecta del análisis proximal de las cepas de microalgas

Análisis	Resultado	Laboratorio	Descripción
Espectro NIR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (100:0:0:0)*
Espectro MIR-ATR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (100:0:0:0)
Espectro NIR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (70:10:10:10)
Espectro MIR-ATR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (70:10:10:10)
Espectro NIR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (40:20:20:20)
Espectro MIR-ATR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (40:20:20:20)
Espectro NIR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (31:23:23:23)
Espectro MIR-ATR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (31:23:23:23)
Espectro NIR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (40:0:30:30)
Espectro MIR-ATR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (40:0:30:30)
Espectro NIR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (40:30:0:30)
Espectro MIR-ATR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (40:30:0:30)
Espectro NIR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (0:100:0:0)
Espectro MIR-ATR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (0:100:0:0)
Espectro NIR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (0:0:100:0)
Espectro MIR-ATR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (0:0:100:0)
Espectro NIR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (0:0:0:100)
Espectro MIR-ATR	ok	ICP	Chaetoc-Lip-Pro-Carb (0:0:0:100)
Espectro MIR-ATR	ok	ICP	Chaetoceros

*Chaetoc-Lip-Pro-Carb: Mezcla de *Chaetoceros gracilis*, lípidos, proteínas y carbohidratos

Los resultados de estos análisis preliminares indican que es factible desarrollar una metodología para la determinación indirecta del análisis proximal de las muestras de biomasa de microalgas, lo que representaría un gran ahorro en tiempo y reactivos para la selección de las cepas más promisorias para los objetivos propuestos. El montaje de la técnica requiere, sin embargo, disponer de biomasa de microalgas de diferentes cepas caracterizadas en los parámetros o analitos que se desea cuantificar. Este análisis preliminar también indicó que la mejor técnica para realizar la toma de los espectros infrarrojos es por ATR puesto que por transmitancia los espectros presentan baja relación señal ruido en la región que se requiere analizar y poca reproducibilidad por la dificultad de lograr una pastilla siempre del mismo espesor.

En la Tabla B2 se presenta los resultados de una primera evaluación de la correlación entre las absorbancias de diferentes regiones del espectro ATR-MIR y la concentración de lípidos en la biomasa, en un análisis de correlación de mínimos cuadrados parciales o PLS.

Tabla B2. Valores de contenido de lípidos reales y predichos por análisis PLS de la primera derivada de los espectros ATR-MIR de las muestras relacionadas en la Tabla B1

Descripción de la Muestra	PLS 1era derivada	
	% Lípidos (muestras)	PC_03 (muestras)
	Real	Calculado
Chaetoc-Lip-Pro-Carb (70:10:10:10)	10	11,88
Chaetoc-Lip-Pro-Carb (40:20:20:20)	20	20,03
Chaetoc-Lip-Pro-Carb (31:23:23:23)	23	22,886
Chaetoc-Lip-Pro-Carb (40:0:30:30)	0	-1,063
Chaetoc-Lip-Pro-Carb (40:30:0:30)	30	29,267

ANEXO C: FICHA TÉCNICA DE REACTIVOS

Tabla C1. Reactivos químicos empleados en el desarrollo experimental

	Hexano	Alcohol etílico (anhidro)	Ciclohexano	Ácido sulfúrico	Ácido clorhídrico fumante	Metanol
Formula Química	C ₆ H ₁₄	CH ₃ CH ₂ OH	C ₆ H ₁₂	H ₂ SO ₄	HCl	CH ₃ OH
Masa Molecular	86,2	46,1	84,2	98,1	36,5	32,0
Pureza (% p/v)	98,5	99,9	99,0	97,0	37,0	99,9
Gravedad Específica (Agua=1) a 20 °C	0,66	0,793	0,78	1,84	1,19	0,79
Punto de Ebullición (°C) a 1 atm	69	78,3	81	~ 335	-----	64,5
Índice de polaridad	0,0	5,2	0,2	-----	-----	5,1
Punto de Fusión (°C)	- 94,3	- 114,5	6	~ 3	-----	- 98
Presión de Vapor (hPa) a 20 °C	160	59	103	~0,0001	190	128
Punto de Inflamación (°C)	-22	12	-18	-----	-----	11

Además, tanto el ácido sulfúrico como el ácido clorhídrico son reactivos corrosivos y solubles en agua (20°C).

La información suministrada en la tabla C1 se obtuvo del catálogo de reactivos y productos 2008-2010 de Merck.

ANEXO D: PRINCIPALES EQUIPOS EMPLEADOS

Tabla D1. Equipos empleados en el desarrollo experimental

Equipo	Especificación
<p>Balanza analítica</p> 	<p>Serie 320XB, marca Precisa Gravimetrics AG, máx 220 g e = 0,001 g, mín 0,01 g d = 0,0001 g</p>
<p>Mantas de calentamiento</p> 	<p>Marca Electrothermal, 110/120 V 50/60 Hz, 150 W</p>
<p>Equipo Soxhlet</p> 	<p>Matraz fondo plano capacidad 500 ml con esmerilado 24/40, tubo extractor Soxhlet capacidad 250 ml con esmerilado 45/40 – 24/40, y condensador de bolas con esmerilado 45/40</p>
<p>Plancha de calentamiento con agitación</p> 	<p>Modelo MSH-20D, marca WISESTIR, 110 V, 1,2 Kw</p>

Bomba de extracción



Marca Emerson, 115 V 60 Hz, 1725 rpm, 1/6 H.P.

Autoclave cilíndrica



Capacidad 25 L, Modelo 25-X

Horno digital de convección



Marca WTC binder, 115 V 60 Hz, 1,20 kW,
temperatura máxima 300 °C

ANEXO E: DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO CON EL CUAL SE OBTIENEN LOS MEJORES RESULTADOS

MÉTODO DE DISRUPCIÓN CELULAR METANOL-ÁCIDO SULFÚRICO

Objetivo: Permitir el debilitamiento y/o disrupción de la pared celular de las microalgas.

Materiales, equipos y reactivos:

- Balanza analítica
- Autoclave cilíndrica 25 L
- Sistema de filtración al vacío
- Papel de filtro cuantitativo franja azul
- Horno digital de convección
- Ácido sulfúrico
- Metanol
- Agua destilada.
- Balón aforado fondo plano de 100 ml
- Recipientes de vidrio para llevar a autoclave (botellas)
- Equipo de seguridad (bata, guantes, máscara de seguridad industrial)
- Cámara extractora de vapores
- Frasco lavador
- Probeta graduada de 100 ml
- Pipeta y pera
- Mortero

El procedimiento realizado para aplicar el método de disrupción celular a la biomasa de microalgas se describe a continuación:

PROCEDIMIENTO:



1. Secado de la materia prima en un horno a 105 °C durante 4 h.



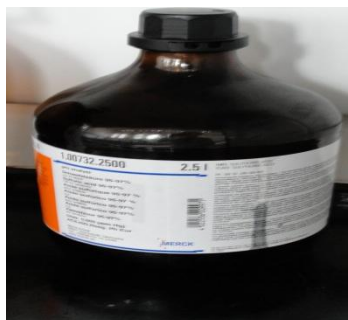
2. Macerar la biomasa seca, y pesar 10 muestra.



3. Preparar la solución de metanol-agua al 3,32 [% v/v].



4. Adicionar la solución anterior con una relación biomasa-licor de 1:10.



5. Posteriormente, se añade ácido sulfúrico a una concentración de 0,6 [M].



6. Llevar la mezcla a una autoclave, 15 psi 120 °C por 247 min.



7. Separar la biomasa de la fase líquida mediante filtración al vacío.



8. Lavar la biomasa pretratada con 50 ml de agua destilada en tres ocasiones.



9. Secar al horno a 105 °C durante 4 horas, y macerar nuevamente.

EXTRACCION DE ACEITE MEDIANTE MÉTODO SOXHLET

Objetivo: Extraer la mayor cantidad de extracto lipídico de las microalgas utilizadas.

Materiales y reactivos:

- Manta de calentamiento
- Equipo de extracción Soxhlet (matraz, tubo Soxhlet, condensador)
- Papel de filtro
- Soporte universal
- Dos pinzas y dos nueces
- Cronómetro
- Embudo
- Erlenmeyer 250 ml
- Equipo de destilación
- Balanza analítica
- Hexano
- Cámara de extracción de vapores

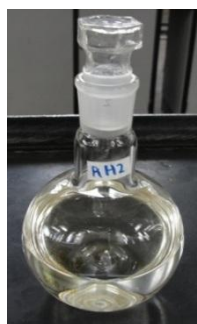
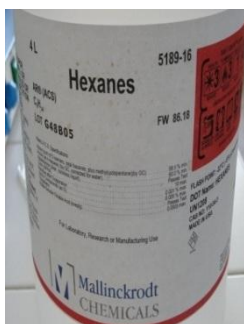
PROCEDIMIENTO:



1. Pesar, con precisión, 5,05 g de biomasa pretratada.

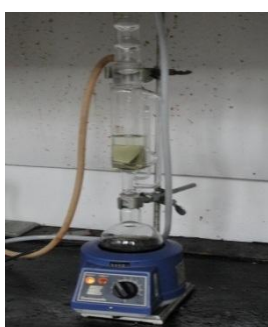


2. Envolver la muestra en un cartucho fabricado con papel de filtro e introducirlo en el tubo Soxhlet.

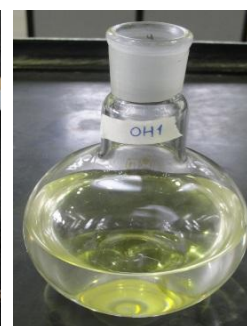
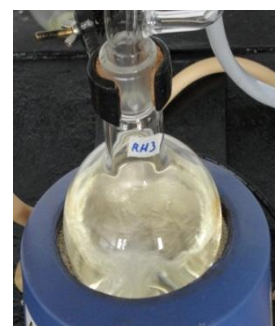
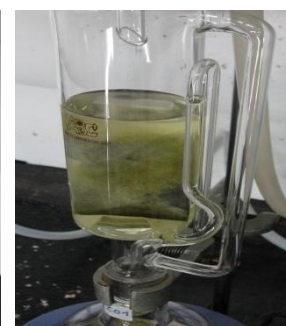
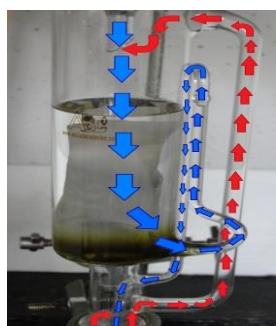


3. Pesar el matraz limpio y seco.

4. Introducir 300 ml de hexano en el matraz (cantidad suficiente para que se llene el tubo Soxhlet y a su vez que el matraz no se seque durante el proceso debido a pérdidas de solvente) y montar el dispositivo.



5. Poner en marcha la manta de calentamiento y regular el caudal del condensador. El hexano alcanza la temperatura de ebullición (69°C), se evapora y llega al refrigerante donde se condensa y cae, gota a gota, sobre el cartucho.



6. Mantener el dispositivo funcionando por 8 horas. En cada ciclo se observa cómo se vacía el compartimiento del tubo Soxhlet sifonando todo el contenido hacia el matraz.

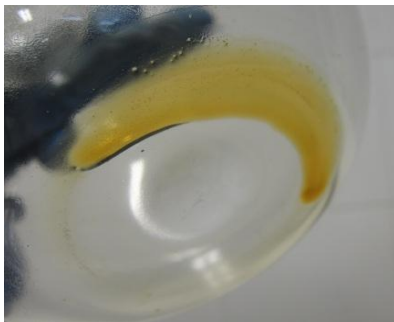
7. En el último ciclo, cuando se haya completado la extracción (8 horas), apagar la manta, deshacer el montaje y retirar el matraz



8. Puesto que se requiere obtener un extracto con la menor cantidad posible de sólidos residuales se hace uso de la filtración por gravedad.



9. Colocar el matraz que contiene el extracto lipídico y solvente, en un sistema de destilación simple para separar el hexano del



10. El solvente remanente se retira por medio de evaporación, hasta alcanzar peso constante.



11. Pesar el matraz con el extracto lipídico.



12. Realizar los cálculos pertinentes.

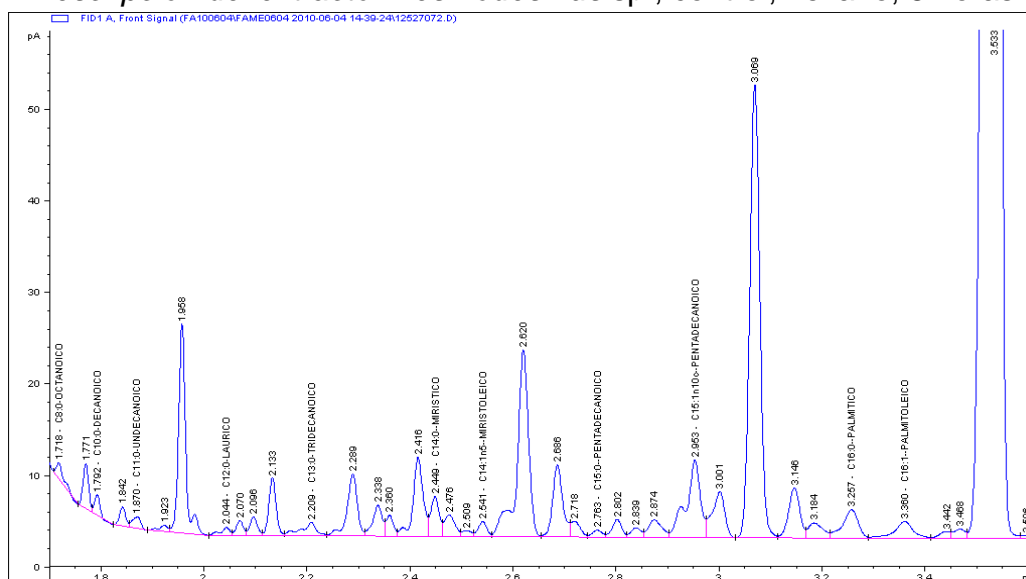


13. Finalmente, el extracto obtenido se guarda en recipientes herméticamente cerrados para su posterior caracterización.

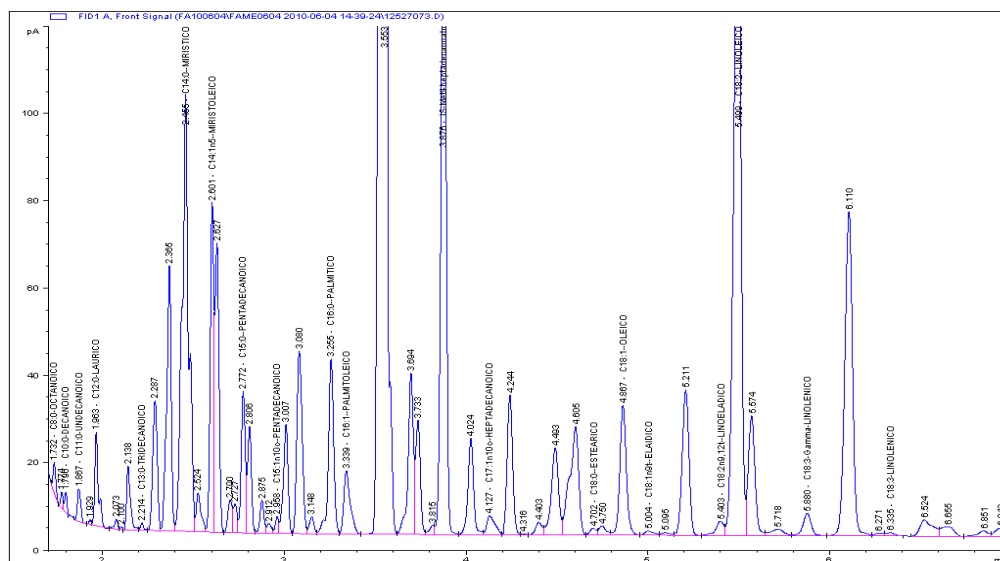
ANEXO F. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos fueron determinado utilizando la técnica de cromatografía de gases en un cromatógrafo Agilent 7890 con columna DB5-HT de 15 metros y detector FID (detector de ionización de la llama). Caracterización realizada por parte del Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL.

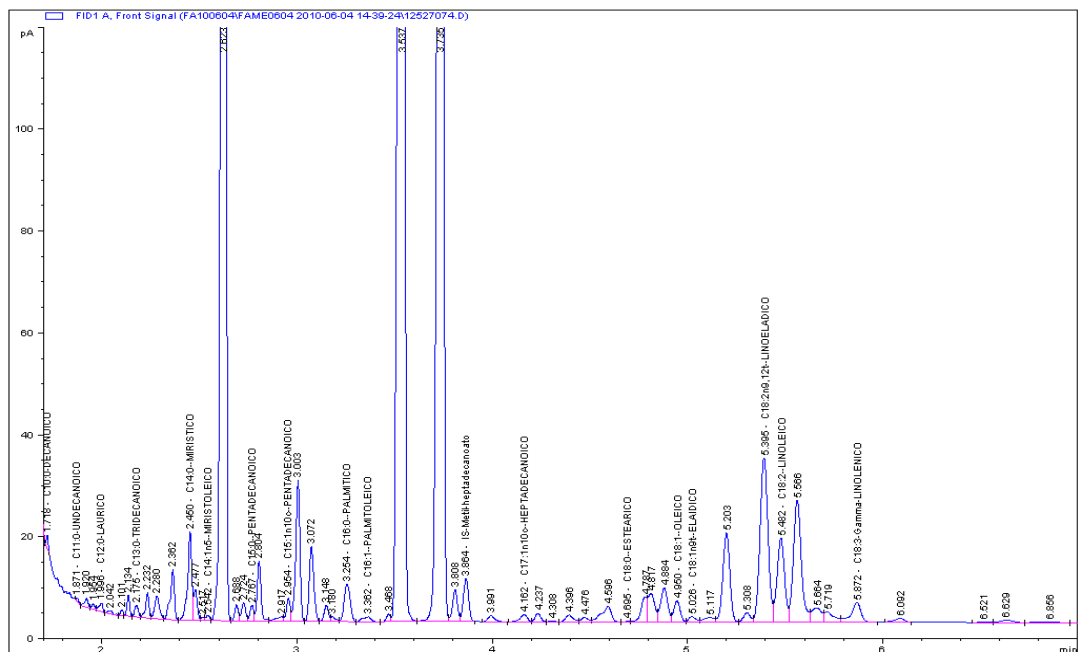
Descripción del extracto: Desmodemus sp., control, hexano, 8 horas



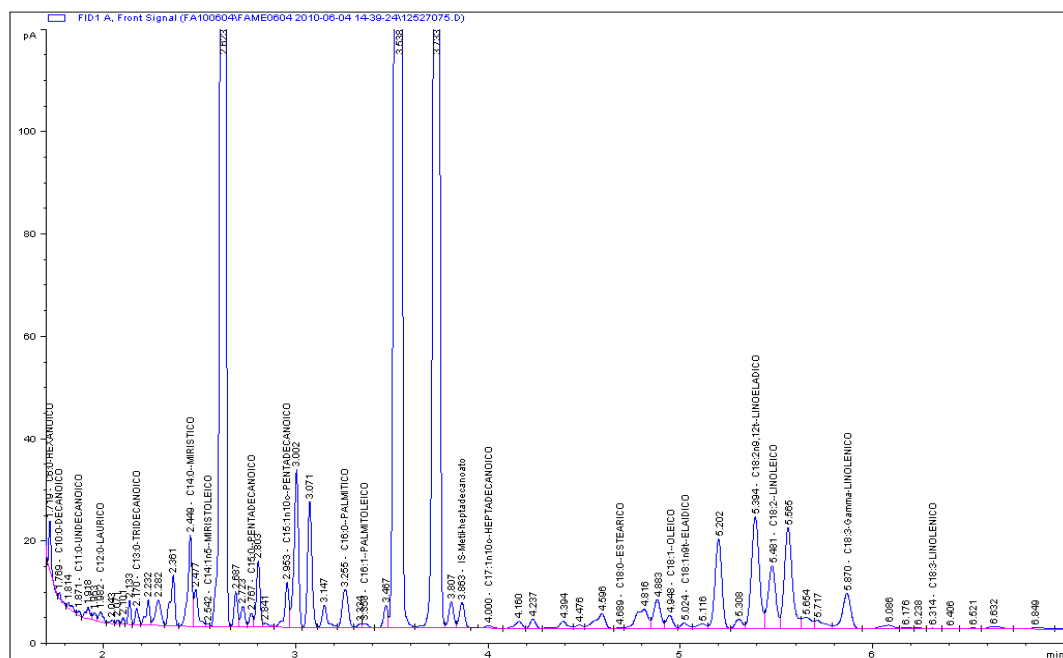
Descripción del extracto: Desmodemus sp., metanol-H₂SO₄, hexano, 8 horas



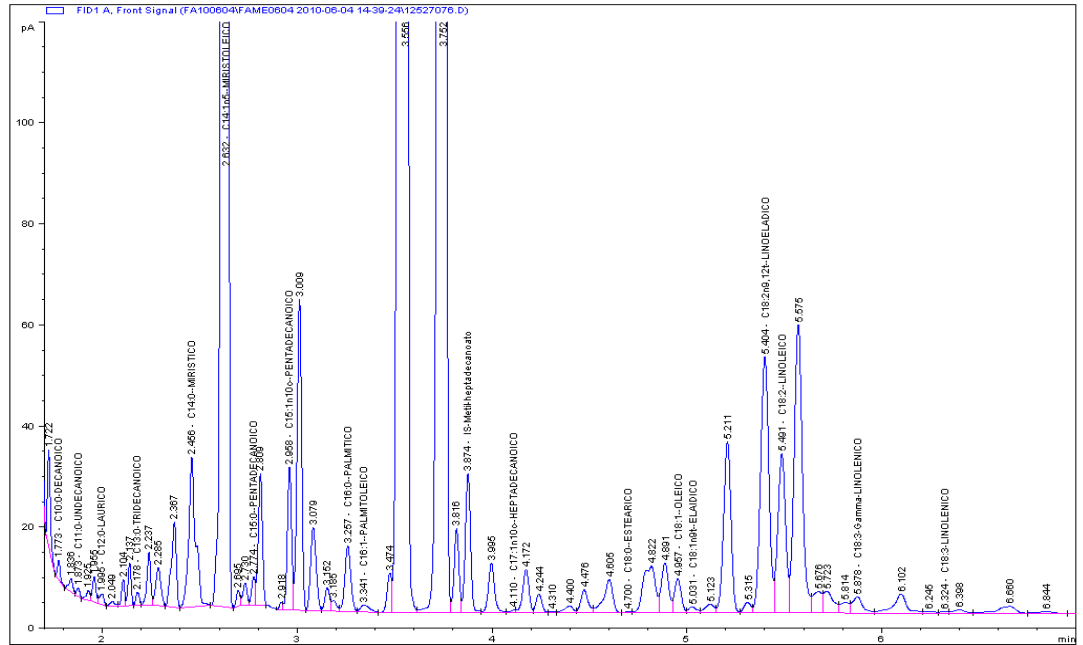
Descripción del extracto: *Amphiprora* sp., control, hexano, 8 horas



Descripción del extracto: *Amphiprora* sp., HCl 4 [M] 1 min, hexano, 8 horas



Descripción del extracto: *Amphiprora* sp., Metanol-H₂SO₄, hexano, 8 horas



Descripción del extracto: *Amphiprora* sp., Metanol-HCl, hexano, 8 horas

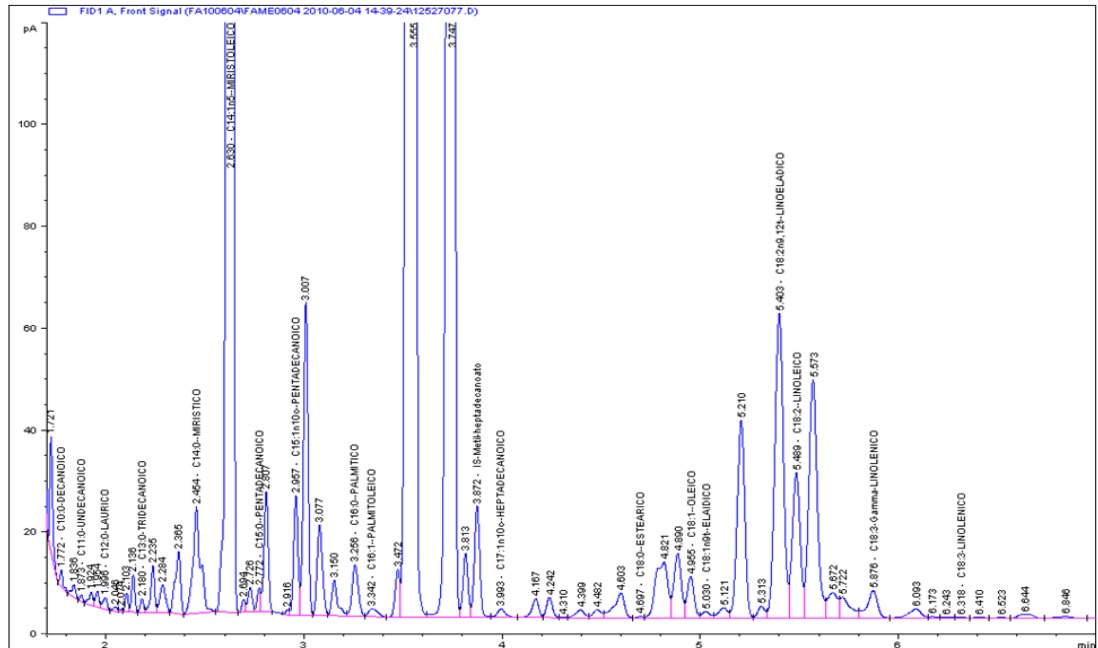


Tabla F1. Resultados obtenidos en la caracterización para algunos extractos*

N°	Nombre del ácido graso	DESCRIPCIÓN DEL EXTRACTO					
		Solvente hexano, tiempo de extracción 8 horas					
		Desmodemus sp.		Amphiprora sp.			
		Control	Metanol-H ₂ SO ₄	Control	HCl 4 [M] 1 min	Metanol-H ₂ SO ₄	Metanol-HCl
ÁCIDOS GRASOS (%)							
1	C10:0-DECANOICO	0,7%	0,2%	0,0%	0,3%	0,5%	0,4%
2	C11:0-UNDECANOICO	0,3%	0,6%	0,1%	0,3%	0,6%	0,2%
3	C12:0-LAURICO	0,2%	0,2%	0,4%	0,3%	0,2%	0,2%
4	C13:0-TRIDECANOICO	0,0%	0,1%	1,0%	1,3%	0,5%	0,5%
5	C14:0--MIRISTICO	0,9%	16,7%	9,0%	9,4%	11,3%	8,6%
6	C14:1n5--MIRISTOLEICO	0,0%	7,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
7	C15:0--PENTADECANOICO	0,2%	3,3%	1,4%	1,2%	1,1%	0,9%
8	C15:1n10c--PENTADECENOICO	2,9%	0,3%	2,2%	4,9%	6,7%	5,4%
9	C16:0--PALMITICO	1,2%	5,3%	5,5%	5,7%	4,3%	3,4%
10	C16:1--PALMITOLEICO	0,0%	2,3%	0,0%	0,4%	0,7%	0,8%
11	C17:0 HEPTADECANOICO	2,3%	21,3%	5,4%	3,2%	8,0%	6,3%
12	C17:1n10c--HEPTADECENOICO	0,0%	0,9%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
13	C18:0--ESTEARICO	0,1%	0,2%	0,1%	0,2%	0,1%	0,1%
14	C18:1--OLEICO	0,6%	4,9%	5,9%	5,1%	4,1%	5,1%
15	C18:1n9t--ELAIDICO	0,2%	0,2%	3,3%	2,2%	2,6%	3,1%
16	C18:2n9,12t--LINOELADICO	0,1%	0,6%	31,7%	21,6%	23,6%	27,4%
17	C18:2--LINOLEICO	85,0%	28,9%	15,2%	11,7%	13,7%	12,3%
18	C18:3-Gamma-LINOLENICO	0,0%	1,0%	4,6%	7,5%	1,9%	3,2%
19	C18:3-LINOLENICO	0,2%	0,1%	0,0%	0,2%	0,2%	0,2%
20	C20:0--ARAQUIDICO	1,5%	0,4%	1,2%	0,7%	0,7%	0,8%
21	C20:1--GADOLEIC	0,3%	0,0%	0,4%	0,0%	0,7%	0,4%
22	C20:2n11,14c-EICOSANODIOICO	0,0%	0,0%	3,7%	2,7%	0,9%	3,3%
23	C21:0-HENEICOSANOICO	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
24	C20:4-ARAQUIDONICO	0,1%	0,3%	0,3%	0,6%	0,2%	0,2%
25	C20:3-EICOSATRIENOICO	0,5%	0,8%	0,8%	0,4%	0,5%	0,5%
26	C20:5-ECOSAPENTAENOICO	0,4%	0,3%	0,0%	0,3%	0,1%	0,2%
27	C22:0--BEHENICO	0,3%	0,3%	0,8%	0,5%	0,6%	0,5%
28	C22:1n13c--ERUCICO	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
29	C22:2-DOCOSADIENOICO	0,9%	0,3%	3,9%	10,2%	3,5%	4,8%
30	C23:0-TRICOSANOICO	0,4%	0,1%	0,4%	0,4%	0,1%	0,4%
31	C24:0--LIGNOCERICO	0,5%	0,0%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
32	C24:1-EICOSAPENTANOICO	0,0%	1,8%	0,0%	0,0%	0,2%	0,1%
33	C24:1--NERVONICO	0,0%	0,2%	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%
	Otros AG%	0,3%	0,6%	2,3%	8,1%	12,1%	10,5%
	Total AG, %	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Acilgliceroles, % área	28,9%	24,7%	7,5%	7,4%	6,5%	7,1%

* Resultados suministrados por parte del Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL.