

**ADAPTACIÓN DEL MÉTODO *BLIGH & DYER* A LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS  
DE MICROALGAS NATIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

**LEISLLY DARIANA GALINDO VEGA**

**SILVIA SUSANA GONZÁLEZ MUÑOZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS**

**ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2010**

**ADAPTACIÓN DEL MÉTODO *BLIGH & DYER* A LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS  
DE MICROALGAS NATIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

**LEISLLY DARIANA GALINDO VEGA**

**SILVIA SUSANA GONZÁLEZ MUÑOZ**

**Trabajo presentado como requisito 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**

**Ángel Darío González Delgado**

**Ingeniero Químico**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS**

**ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2010**

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus agradecimientos a:

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, por su apoyo económico a través del proyecto “Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel” con código 2008D32006-6710.

INSTITUTO COLOMBIANO DE PETRÓLEO, por proveer la biomasa de microalgas a trabajar, por su aporte en conocimiento y experiencia por medio del Doctor ALEXANDER GUZMÁN MONSALVE quien nos orientó durante la investigación.

CORPORACIÓN INSTITUTO DE MORROSQUILLO, por proveer la biomasa de microalgas a trabajar.

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, incondicional y constante apoyo.

INGENIERO EDUARDO SANCHEZ TUIRAN, por su voto de confianza para la realización de este proyecto.

EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO, del laboratorio de procesos por su desinteresada colaboración, paciencia y todos sus valiosos aportes.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN CIDES Y AL LABORATORIO DE BIOMASA, por permitirnos contar con todos los medios necesarios para el desarrollo de esta investigación.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales.

A Dios, nuestras familias y amigos, por su apoyo afectivo y ser nuestra fortaleza.

*Al más especial de todos, a mi Señor, Jesús, quien me dio la fe, la fortaleza, la salud y la esperanza para terminar este trabajo.*

*A mis padres, Carlos Julio y Yolanda por su dedicación, amor y apoyo incondicional, durante mi formación tanto personal como profesional pues no escatimaron esfuerzos ni recursos y son los artífices de este logro. Mi triunfo es el de ustedes, ¡los amo!*

*A mis hermanos Luis Carlos, Edward Fabián y Daniel Felipe quienes han puesto en mí su confianza y son mis razones de vida.*

*A mi tío padre por su ejemplo de fortaleza, voz de aliento y grandes motivaciones para el desempeño y culminación de mi carrera.*

*A mis queridos abuelitos por sus enseñanzas y por confiar en mis propósitos.*

*A mi novio Juan Pablo Ramírez, quien me brindó su amor, su cariño, su estímulo y su apoyo constante.*

*A mis compañeros y amigos, por todos los momentos compartidos, en especial a Sílvia Susana por brindarme su amistad durante toda la carrera universitaria.*

*Y a todas aquellas personas que me han acompañado y apoyado a lo largo de mi vida.*

*LEISLLY DARIANA GALINDO VEGA*

*Esta etapa que culmino me llena de felicidad y nostalgia.*

*Doy infinitas gracias a Dios por permitirme vivir y estar rodeada de lindas personas que alegran mi día a día.*

*A mi papá Jaime, por ser ese gran ejemplo a seguir, a quien extraño cada segundo de mi vida desde su partida; pero sé que junto a Jaime Andrés, mi ángel de la guarda me guía y protege.*

*A mi mamá Socorro, por estar siempre conmigo, por todo su amor y apoyo incondicional, por ser mi amiga, mi fortaleza, y el motivo para empezar una nueva etapa.*

*A Ferney Mauricio por todo su amor, apoyo y comprensión, a quien también felicito por todo su esfuerzo y dedicación que lo han llevado a culminar igualmente su etapa universitaria.*

*A mis amigos y compañeros del ayer y del hoy por todos y cada uno de los momentos compartidos especialmente a Leislly Dariana por su amistad y acompañamiento en este proyecto.*

*SILVIA SUSANA GONZÁLEZ MUÑOZ*

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	21
1. MARCO TEÓRICO.....	22
1.1. GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS.....	22
1.1.1. <i>Closterium</i> .....	22
1.1.2. <i>Botryococcus braunii</i> .....	23
1.1.3. <i>Nannocloropsis</i> .....	23
1.1.4. <i>Guinardia</i> .....	23
1.1.5. <i>Amphiprora</i> .....	23
1.2. GENERALIDADES DE LOS LÍPIDOS.....	23
1.2.1. Glicéridos.....	24
1.2.2. Ácidos Grasos .....	24
1.2.3. Ácidos grasos en las microalgas .....	24
1.3. EXTRACCION DE ACEITE DE MICROALGAS .....	25
1.3.1. Disrupción celular .....	25
1.3.2. Métodos de extracción .....	26
1.3.2.1. Método de extracción <i>Bligh &amp; Dyer</i> .....	27
1.4. DISEÑO EXPERIEMENTAL.....	28
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	29
2.1. MATERIALES.....	29
2.1.1. Reactivos.....	29

2.1.2.	Biomasa de microalgas .....	29
2.2.	EQUIPOS .....	30
2.3.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	31
2.3.1.	Disrupción celular. ....	31
2.3.1.1.	Pretratamiento organosolv.....	31
2.3.1.2.	Hidrólisis ácida .....	31
2.3.1.3.	Extracción.....	32
2.3.1.4.	Agitación.....	32
2.3.1.5.	Centrifugación .....	32
2.3.1.6.	Separación .....	32
2.3.1.7.	Volatilización.....	33
2.3.2.	Diseño experimental para la obtención de las mejores condiciones de agitación.....	33
2.3.3.	Caracterización de las muestras .....	33
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	34
3.1.	ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	34
3.1.1.	Efecto de la frecuencia de centrifugación sobre la separación de las fases.....	34
3.1.3.	Efecto de la adición de agua al inicio de la agitación .....	34
3.1.4.	Efecto de la frecuencia de agitación.....	35
3.1.5.	Estudio estadístico del efecto del tiempo y la frecuencia de agitación ..	36
3.1.5.1.	Análisis de la interacción entre el tiempo de homogenización y la frecuencia de agitación.....	37
3.1.6.	Efecto del método de disrupción celular.....	39

3.1.6.1. Efecto del método de disrupción celular sobre la separación de componentes de la biomasa de microalgas.....	40
3.1.7. Retención de biomasa por etapa durante el desarrollo de la metodología de extracción.....	41
3.1.8. Retención de biomasa según especie y método de disrupción celular utilizado.....	42
3.2. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS LIPÍDICOS. ....	43
3.2.1. Rendimiento de la extracción <i>Bligh &amp; Dyer*</i> .....	43
3.2.2. Caracterización de los extractos lipídicos.....	44
CONCLUSIONES .....	46
RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA .....	48
ANEXOS.....	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metodología experimental desarrollada. ....	29
<b>Figura 2.</b> Diagrama de bloques del proceso de disrupción celular aplicado. ....	31
<b>Figura 3.</b> Diagrama de bloques del proceso de extracción de lípidos aplicado.....	32
<b>Figura 4.</b> Efecto de la frecuencia de agitación sobre el porcentaje de extracción.	35
<b>Figura 5.</b> Diagrama de Pareto. Efecto de la frecuencia de homogenización y tiempo de agitación sobre el porcentaje de extracto lipídico.....	37
<b>Figura 6.</b> Gráfico de efectos principales para el porcentaje de extracto lipídico. ..	38
<b>Figura 7.</b> Efecto de frecuencia de homogenización y tiempo de agitación sobre el porcentaje de extracto lipídico. a) Diagrama superficie de respuesta b) Diagrama de contorno o curva de nivel.....	38
<b>Figura 8.</b> Efecto de la disrupción celular sobre el porcentaje de extracción para la especie <i>Guinardia</i> a las condiciones óptimas de extracción.....	39
<b>Figura 9.</b> Efecto de la disrupción celular sobre el porcentaje de extracción para la especie <i>Amphiprora</i> a las condiciones óptimas de extracción.....	40
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de biomasa que pasa a formar parte del licor de lisis celular. ....	41
<b>Figura 11.</b> Biomasa retenida en cada etapa de la metodología de extracción y biomasa residual para la especie <i>Closterium</i> a 14 minutos de agitación.....	42
<b>Figura 12.</b> Biomasa retenida en cada etapa de la metodología de extracción y biomasa residual para las especies <i>Closterium</i> , <i>Guinardia</i> y <i>Amphiprora</i> a las condiciones óptimas de la extracción. ....	43

<b>Figura 13.</b> Especies de microalgas utilizadas en la parte experimental. a) <i>Botryococcus Braunii</i> , b) <i>Amphiprora</i> , c) <i>Closterium</i> , d) <i>Guinardia</i> y e) <i>Nannocloropsis</i> .	54
<b>Figura 14.</b> a) Prueba sin biomasa. b) Prueba con biomasa	55
<b>Figura 15.</b> a) Autoclave esterilizadora eléctrica, b) Balanza analítica.	57
<b>Figura 16.</b> Equipo para filtración al vacío.	57
<b>Figura 17.</b> a) Centrífuga <i>PowerSpinTM</i> , b) Ultraturrax <i>Heidolph</i> .	58
<b>Figura 18.</b> Agitación. a) Primera y segunda agitación. b) Tercera agitación (adición de agua).	59
<b>Figura 19.</b> Separación de las fases luego de la centrifugación. a) Especie <i>Closterium</i> sin interrupción celular, b) Especie <i>Guinardia</i> pretratada con organosolv c) Especie <i>Amphiprora</i> hidrolizada con HCl.	59
<b>Figura 20.</b> Filtración a) Montaje de filtración de la fase lipídica, b) Extracto lipídico.	60
<b>Figura 21.</b> Volatilización del cloroformo, de los extractos lipídicos y de la biomasa residual.	60
<b>Figura 22.</b> Biomasa retenida a) En las probetas utilizadas durante la agitación, b) Tubos de centrífuga.	62
<b>Figura 23.</b> Biomasa retenida en los papeles de filtro a) Especie <i>Nannocloropsis</i> , b) Especie <i>Closterium</i> .	62
<b>Figura 24.</b> Biomasa residual de las especies a) y c) <i>Closterium</i> pretratada con organosolv, b) <i>Amphiprora</i> sin interrupción celular y d) <i>Botryococcus braunii</i> sin interrupción celular.	63
<b>Figura 25.</b> Extractos lipídicos de las especies a) <i>Botryococcus braunii</i> sin interrupción celular, b) <i>Nannocloropsis</i> sin interrupción celular c) <i>Guinardia</i> con pretratamiento organosolv, d) <i>Amphiprora</i> hidrolizada con HCl.	64

<b>Figura 26.</b> Cromatograma (análisis FAMES) del extracto lipídico de <i>Nannocloropsis</i> sin disrupción celular.....	65
<b>Figura 27.</b> Cromatograma (análisis FAMES) ampliado de los primeros 7 minutos del extracto lipídico de <i>Nannocloropsis</i> sin disrupción celular. ....	65
<b>Figura 28.</b> Cromatograma (análisis FAMES) del extracto lipídico de <i>Botryococcus braunii</i> sin disrupción celular.....	66
<b>Figura 29.</b> Cromatograma (análisis FAMES) ampliado de los primeros 7 minutos del extracto lipídico de <i>Botryococcus braunii</i> sin disrupción celular.....	66

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de algunas metodologías de la aplicación del método <i>Bligh &amp; Dyer</i> para la extracción de lípidos.....	28
<b>Tabla 2.</b> Herramientas usadas para el análisis estadístico.....	28
<b>Tabla 3.</b> Resultados del efecto de la adición de agua en la primera parte de la agitación .....	35
<b>Tabla 4.</b> Valores y niveles de las variables estudiadas. ....	36
<b>Tabla 5.</b> Matriz del diseño experimental con porcentajes de extracto lipídico obtenidos durante la extracción. ....	36
<b>Tabla 6.</b> Rendimiento de la extracción <i>Bligh &amp; Dyer*</i> respecto al extracto lipídico obtenido por el ICP-ECOPETROL. ....	44
<b>Tabla 7.</b> Perfil de ácidos grasos presentes en las especies <i>Botryococcus braunii</i> y <i>Nannocloropsis</i> . ....	45
<b>Tabla 8.</b> Principales características de los reactivos utilizados. ....	56

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A. ESPECIES DE MICROALGAS UTILIZADAS .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO B. ACCIÓN DEL AGUA EN LA SEPARACIÓN DE LAS FASES .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO C. REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO D. PRINCIPALES EQUIPOS USADOS EN LA EXPERIMENTACION.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO E. IMÁGENES DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO F. PROTOCOLO DEL MÉTODO <i>BLIGH &amp; DYER</i> APLICADO A LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS NATIVAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO G. RETENCION DE BIOMASA EN LAS ETAPAS DE LA EXPERIMENTACIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO H. BIOMASA RESIDUAL .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO I. EXTRACTOS LIPÍDICOS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO J. CROMATOGRAMAS (ANÁLISIS FAMES).....</b>	<b>65</b>

## RESUMEN

**Título:** ADAPTACIÓN DEL MÉTODO *BLIGH & DYER* A LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS NATIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL.\*

**Autores:** Leislly Dariana Galindo Vega, Silvia Susana González Muñoz.\*\*

**Palabras claves:** Microalgas, biomasa, disrupción celular, extracción, método *Bligh & Dyer*, lípidos.

En la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas, las etapas de disrupción celular y extracción de lípidos son importantes para la obtención de triglicéridos que pueden ser transesterificados a biodiesel y glicerina. En este trabajo se adaptó el método *Bligh & Dyer* para la extracción de lípidos de microalgas nativas aplicando conjuntamente mecanismos de disrupción celular para favorecer el proceso de extracción. Las especies de microalgas empleadas en la parte experimental de este estudio fueron: *Botryococcus braunii*, *Nannocloropsis*, *Closterium*, *Guinardia* y *Amphiprora*. El método *Bligh & Dyer* emplea cloroformo, metanol y agua como solventes y contempla las etapas de agitación, centrifugación, filtración, y destilación. La adaptación del método consistió en determinar: la relación biomasa/solvente, el efecto de agregar agua en la primera parte de la agitación y las mejores condiciones de agitación (tiempo [min] y frecuencia [rpm]). Se encontró que las mejores condiciones del método *Bligh & Dyer* a la extracción de lípidos de microalgas nativas fueron: relación biomasa/solvente 1:20, no agregar agua en la primera parte de la agitación, agitar a 5000 rpm durante 14 minutos y centrifugar a 3400 rpm durante 15 minutos. Los mecanismos de disrupción celular aplicados fueron: Hidrólisis ácida y pretratamiento organosolv. Estos métodos de disrupción celular permitieron obtener extractos lipídicos más ricos en lípidos luego de realizar la extracción con el método *Bligh & Dyer*, pero desfavorecieron significativamente los porcentajes totales de extracción. Finalmente se identificaron los ácidos grasos presentes en los extractos lipídicos empleando cromatografía de gases a cargo del Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL.

Este trabajo fue realizado por la Universidad Industrial de Santander dentro del desarrollo 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 Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Dr. Sc, Ph.D. Viatcheslav Kafarov, Codirectores: Ph.D. Alexander Guzmán Monsalve, Ingeniero Químico Ángel Darío González Delgado.

## ABSTRACT

**Title:** ADAPTATION OF THE *BLIGH & DYER* METHOD TO LIPID EXTRACTION FROM NATIVE MICROALGAE FOR BIODIESEL PRODUCTION.\*

**Authors:** Leislly Dariana Galindo Vega, Silvia Susana González Muñoz.\*\*

**Keywords:** Microalgae, biomass, cell disruption, extraction, *Bligh & Dyer* method, lipids.

In the biodiesel production process from microalgae, the cell disruption and lipid extraction stages are important for obtaining triglycerides that can be transesterified to biodiesel and glycerol. In this work, the *Bligh & Dyer* method was adapted for lipid extraction from native microalgae using cell disruption mechanism for improve the extraction process. The microalgae species *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis*, *Closterium*, *Guinardia* y *Amphiprora* were employed for the experimental part. Chloroform-methanol-water are the solvents employed in the *Bligh & Dyer* extraction method, and its steps are homogenization, centrifugation, filtration and distillation. Adaptation of the method was made by determination of: the biomass/solvent ratio, the effect of adding water in the first part of the homogenization and the best homogenization conditions (time [min] and frequency [rpm]). The best conditions for *Bligh & Dyer* method to lipid extraction from native microalgae were: 1:20 biomass/solvent ratio, do not add water in the first part of the homogenization, stirring conditions of 5000 rpm for 14 minutes and centrifuge of 3400 rpm for 15 minutes. Acid hydrolysis and organosolv pretreatment were used as cell disruption mechanism. This mechanism allowed to obtain extracts with high lipid content after performing the extraction with *Bligh & Dyer* method, but decreases significantly the total extraction yield. Finally, the fatty acids profile of lipid extracts were determined using gas chromatography (GC) by the Colombian Petroleum Institute ICP-ECOPETROL.

This work was developed by Industrial University of Santander 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 Corporación Instituto de Morrosquillo.

---

\* Undergrade project

\*\* Faculty of Physicochemical Engineering, Chemical Engineering School. Director: Dr. Sc, Ph.D. Viatcheslav Kafarov, Codirectors: Ph.D. Alexander Guzmán Monsalve, Chemical engineer Ángel Darío González Delgado.

## INTRODUCCIÓN

El cambio climático es uno de los grandes desafíos del siglo XXI debido a que sus impactos son globales y cada vez más severos sobre la estabilidad económica, social y ambiental del planeta. En respuesta a esta problemática, las políticas ambientales han favorecido el incremento en el uso de biocombustibles a nivel mundial, principalmente aquellos que pueden sustituir los combustibles fósiles utilizados en el transporte vehicular [1]. Actualmente, los biocombustibles en los que se ha invertido más esfuerzo son el etanol a partir de caña de azúcar y maíz y el biodiesel a partir de fuentes oleaginosas. Sin embargo, la sustentabilidad de la producción de estos biocombustibles se ha visto fuertemente cuestionada por la gran demanda de cultivos que estos requieren para su obtención [2]. Para lograr una sustentabilidad económica y ambiental, se requiere que el proceso de producción de biocombustibles no sólo sea renovable, sino que también contribuya al secuestro de CO<sub>2</sub> atmosférico [3]. De esta manera, las microalgas, consideradas como fuente de biocombustibles de tercera generación contribuyen de manera importante a la fijación de CO<sub>2</sub> y pueden ser utilizadas para producir una amplia gama de biocombustibles, tales como el biodiesel, bioetanol, biometano y biohidrógeno [4].

Las microalgas tienen el potencial de asegurar una gran producción de biodiesel por unidad de área debido a su alto contenido de lípidos, el cual supera a todas las fuentes de biodiesel utilizadas en la actualidad [5]. El objetivo principal de este trabajo es adaptar el método de *Bligh & Dyer* [6] a la extracción de lípidos de algunas especies de microalgas nativas empleando y evaluando previamente mecanismos de disrupción celular y proponer un protocolo para su aplicación.

## 1. MARCO TEÓRICO

En la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas, las etapas de disrupción celular y extracción de lípidos son importantes para la obtención de triglicéridos que pueden ser transesterificados a glicerina y biodiesel debido a que la eficiencia de estas etapas contribuye en gran manera a la eficiencia global del proceso.

### 1.1. GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS

Las microalgas son microorganismos eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a la de las plantas [7]. Además, secuestran el CO<sub>2</sub> que se libera a la atmosfera. Su importancia se debe a que produce una amplia variedad de compuestos de interés biotecnológico, como los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades y en cortos periodos de tiempo [8].

Su bioquímica general, depende del genotipo (especies y variedad), etapa de crecimiento, estado nutricional, intensidad de luz y otros factores que afectan el desarrollo de las microalgas y su metabolismo, sin excluir las modificaciones que se hagan en su medio de cultivo [9]. También son una fuente potencial de proteína para su uso en la alimentación humana y animal; y son utilizadas en la purificación de efluentes [10].

A continuación se presentan las principales características de las especies de microalgas utilizadas en este estudio y en el ANEXO A se muestra sus imágenes.

**1.1.1. *Closterium*.** Género perteneciente a la familia *Closteriaceae*. Su estructura celular se compone de una pared celular y un protoplasto. Son alargadas y cilíndricas, unicelulares a menudo con forma semilunar compuesta de dos

semicélulas simétricas individuales. Son algas frecuentes en aguas duras y resistentes a los desagües que contienen cromo [11].

**1.1.2. *Botryococcus braunii*.** Género perteneciente a la familia *Botryococcaceae*. Es un alga colonial que crece principalmente en agua dulce y está ampliamente distribuida en lagos y estanques. Además tiene la singular característica de sintetizar y almacenar altas concentraciones de hidrocarburos de cadena larga [12].

**1.1.3. *Nannocloropsis*.** Género perteneciente a la familia *Monodopsidaceae*. Esta especie es difícil de identificar debido a que sus células son muy pequeñas e indistinguibles de otras clorofitas al observarlas en el microscopio. Se caracteriza por su única estructura bioquímica carente de clorofila y pigmentos xantofilicos y su composición de azúcares es similar a las diatomeas [13].

**1.1.4. *Guinardia*.** Género perteneciente a la familia *Rhizosoleniaceae*. Es una diatomea característica de ambientes salobres y marinos. Sus células son cilíndricas y se combinan para formar cadenas lineales, por lo general de corta duración. Su color es amarillo [13].

**1.1.5. *Amphiprora*.** Género perteneciente a la familia *Amphipleuraceae*. Es una diatomea característica de ambientes salobres y marinos. Contiene sílice polimerizado en sus paredes celulares. Todas sus células almacenan carbón como aceites naturales ó como polímeros de carbohidratos [14].

## **1.2. GENERALIDADES DE LOS LÍPIDOS**

Los lípidos son biomoléculas formados por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Se clasifican en tres grandes grupos: glicéridos, fosfolípidos y esteroides. Estos compuestos son insolubles en agua pero son solubles en solventes orgánicos exceptuando los fosfolípidos que son solubles en grasa y en agua.

**1.2.1. Glicéridos.** Son ésteres de ácidos grasos con glicerina que constituyen el contingente mayoritario de los lípidos de reserva energética, y son muy abundantes en el tejido adiposo animal y en las semillas y frutos de las plantas. La glicerina presenta tres grupos alcoholícos, y por tanto puede aparecer esterificado en una, dos o tres posiciones, dando lugar respectivamente, a monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos [15].

**1.2.2. Ácidos Grasos.** Son componentes comunes de los triglicéridos y de los fosfolípidos y a menudo están unidos al colesterol [16]. Se dividen en saturados o “grasas” (cadenas carbonadas sin dobles enlaces) que son sólidos a temperatura ordinaria y los ácidos grasos insaturados o “aceites” (cadenas carbonadas con dobles enlaces) que son líquidos a las mismas condiciones [17]. Los ácidos grasos saturados se encuentran especialmente en los alimentos de origen animal mientras que los ácidos insaturados se encuentran principalmente en los productos de origen vegetal [16].

**1.2.3. Ácidos grasos en las microalgas.** Las microalgas contienen ácidos grasos en los componentes de sus membranas y en sus fuentes de reserva. La mayor parte de ellos son poliinsaturados y tienen composiciones similares a los demás aceites vegetales utilizados. El contenido de lípidos y ácidos grasos en las microalgas varían de acuerdo a ciertas condiciones de cultivo, en algunos casos, el contenido lipídico puede ser incrementado por la imposición de un régimen austero de nitrógeno u otros factores de estrés celular. Se ha encontrado que las fracciones lipídicas pueden llegar hasta el 80% en peso en base seca, superando en gran cantidad a especies terrestres. El aceite de microalgas contiene principalmente ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico. Los ácidos grasos insaturados representan cerca del 64% en peso de los ácidos grasos totales [8].

En términos biológicos, los ácidos grasos de microalgas resultan ser ideales para el consumo, pero las características de sus enlaces químicos hacen de estos aceites, especies altamente susceptibles de oxidación, disminuyendo su

estabilidad luego de ser transesterificado al igual que sus posibilidades de almacenaje [9]. La oxidación de las cadenas de ácidos grasos produce aldehídos, cetonas, óxidos y ácidos de bajo peso molecular [18].

### **1.3. EXTRACCION DE ACEITE DE MICROALGAS**

Los combustibles de tercera generación se producen a partir de microalgas y otros microorganismos, su obtención está basada en tecnologías emergentes que prometen una gran cantidad de combustible por unidad de área y menores costos de producción [19]. Las etapas clave involucradas en el proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas son el cultivo, cosecha, extracción de lípidos y por último, la transesterificación de estos [20].

Antes de realizar la extracción se considera en algunos casos aplicar mecanismos de disrupción celular debido a que el rendimiento de la extracción depende de la eficiencia de este [19]. Además, actualmente se realizan estudios de la etapa de extracción del aceite de microalgas para su posterior transformación en biodiesel debido a la alta eficiencia y los bajos costos globales del proceso [19].

**1.3.1. Disrupción celular.** Esta etapa es importante en la separación u obtención de productos intracelulares de los microorganismos y se puede realizar basado en acción mecánica como la homogenización, molienda o ultrasonido o por acción no mecánica como liofilización o choque osmótico [18]. Sin embargo, algunos de los problemas asociados con estos métodos son su alto costo, la desnaturalización de las proteínas, la destrucción de productos enzimáticos y su ineficiencia para tratamiento de grandes lotes [21].

Los microorganismos poseen una pared celular externa semipermeable, resistente y rígida, que rodea la membrana protoplasmática y el citoplasma. El citoplasma se compone de ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, enzimas, vitaminas, pigmentos y agua. Con el fin de aislar y extraer estas sustancias desde

el interior de la célula, es necesario romper la pared celular y la membrana protoplasmática [22]. Los polisacáridos contenidos al interior de la célula al someterse a un proceso de disrupción celular se descomponen en monosacáridos o azúcares simples facilitando la extracción de los lípidos [23]. Los investigadores afirman que el tipo de microorganismo, las condiciones de cultivo, la estructura, composición y acondicionamiento previo de la célula afectan la eficiencia de la disrupción celular [24].

**1.3.2. Métodos de extracción.** Los métodos de extracción de aceite utilizados en la obtención de lípidos provenientes de microalgas a nivel de laboratorio son métodos de extracción con solventes químicos, choque osmótico, extracción con fluidos supercríticos, autoclavado, extracción con ultrasonido, extracción asistida con microondas y extracción mediante destrucción mecánica [20].

La extracción de lípidos con solventes químicos ha sido utilizada tradicionalmente para obtener lípidos de origen vegetal y animal [25]. Para el caso de las microalgas, el solvente generalmente es adicionado a la biomasa seca aunque en algunos casos se utiliza biomasa con cierta humedad, lo que disminuye los costos globales del proceso, pero afecta la eficiencia de la extracción [19]. Para este tipo de extracción se emplean solventes orgánicos como alcoholes y alcanos, los cuales absorben los lípidos de la pared celular inflándola y rompiéndola permitiendo a su vez la liberación del contenido intracelular [18]. La selección del sistema de solventes para la extracción de lípidos de algas es muy importante debido a que la eficiencia de la extracción de esta mezcla depende de la permeabilidad de la pared celular así como el tipo de organismo [26] y de la misma forma para otros tejidos [27]. Por ejemplo, para el género *Botryococcus* se ha realizado la extracción en dos etapas: primero empleando hexano para la extracción de lípidos contenidos en la pared celular y finalmente utilizando una mezcla cloroformo-metanol para la extracción de lípidos intracelulares [12].

Una metodología basada en solventes químicos fue propuesta por *Folch* [28] la cual extrae lípidos tanto polares, como no polares, esto se logra debido a la utilización de un solvente no polar, el cual disuelve los lípidos neutros como ésteres de ácidos grasos con glicerol y ésteres de colesterol, en combinación con un solvente relativamente polar, el cual disuelve los lípidos polares como fosfolípidos y colesterol libre presentes en la muestra sometida a extracción. Estas propiedades de los solventes fueron originalmente aprovechadas para desarrollar un método basado en la mezcla metanol/cloroformo, seguido de una purificación de los extractos con una solución de KCl [28]. Luego, en 1959, *Bligh & Dyer* [6] modificaron el método de *Folch*, y obtuvieron un método rápido de extracción de lípidos que es usado en la actualidad y se ha probado con éxito en la extracción de aceite de microalgas [29]. Sin embargo, posee la desventaja de ser poco amigable con el medio ambiente por la toxicidad de los solventes utilizados [30].

**1.3.2.1. Método de extracción *Bligh & Dyer*.** Este método principalmente comprende las etapas de agitación, centrifugación, filtración y destilación, empleando metanol, cloroformo y agua como solventes [25,6]. El metanol es un solvente polar que disuelve los lípidos anfipáticos o polares, por otro lado, el cloroformo es un solvente no polar el cual disuelve los lípidos neutros presentes en la extracción y el agua al ser un disolvente polar permite separar la fase metanol/lípidos polares de la fase cloroformo/lípidos neutros [31,32]. En el ANEXO B se muestra la evidencia del efecto del agua en la separación de las fases.

El método *Bligh & Dyer* ha sido ampliamente utilizado para la extracción de lípidos de diversos tejidos como: pescado [27,6,33], hongos [34], linaza [32], alimentos [25] y microalgas [21,26,29,35]. En la Tabla 1 se muestra el resumen de algunas de las metodologías referenciadas anteriormente, donde se puede observar que las condiciones de operación del método varían de una fuente a otra mientras que otras condiciones no se especifican.

**Tabla 1.** Resumen de algunas metodologías de la aplicación del método *Bligh & Dyer* para la extracción de lípidos.

Condiciones	Metodología			
	A	B	C	D
<b>Muestra</b>	Alimentos	Pescado	Alimentos	Microalga: <i>I. galbana</i>
<b>Biomasa</b>	5 g	1 ml	10 g	5 g
<b>Cloroformo/metanol/agua</b>	2:1:0	2:1:0	2:1:0,8	2:1:1
<b>Tiempo total de agitación</b>	6 min	No especificada	3 min	1 hora
<b>Frecuencia de agitación</b>	No especificada	No especificada	No especificada	No especificada
<b>Centrifugación</b>	10 min a 2000 rpm	5 min a 1000 rpm	10 min a 2000-2500 rpm	No registrada
<b>Filtración</b>	No registrada	No registrada	Por gravedad	Por gravedad
<b>Destilación</b>	Rotoevaporador	No registrada	Rotoevaporador a 60°C	No especificada
<b>Secado</b>	104°C durante 1 hora	No registrada	60° durante 2 horas	No especificada

Fuente: Metodología A [25], B [6], C [36], D [29]

#### 1.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera para obtener datos que al ser analizados estadísticamente proporcionen evidencias objetivas que permitan responder los interrogantes planteados y de esta manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras [37]. Las herramientas de análisis que se utilizaron para este trabajo se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Herramientas usadas para el análisis estadístico.

Herramienta	Definición
<b>Diseño 2<sup>k</sup></b>	Este diseño indica que se estimará el efecto que sobre la variable de respuesta presentan k factores cada uno de estos probado en dos niveles (alto y bajo); se prueban entonces 2 <sup>k</sup> tratamientos.
<b>Diagrama de Pareto</b>	Ilustra un análisis cualitativo de los efectos estandarizados de las variables del diseño experimental y la significancia que tienen estas y sus interacciones, sobre la variable de respuesta.
<b>Diagrama de efectos principales</b>	Ilustra un análisis cuantitativo de la variable de respuesta estimada como función de cada factor experimental.
<b>Superficie de respuesta</b>	Localiza las condiciones óptimas de operación del proceso. Su ventaja es que se pueden observar las estimaciones de la variable de respuesta en todos los posibles niveles de los factores estudiados.
<b>Curvas de nivel</b>	Representan el mismo valor estimado para la variable de respuesta el cuál es generalmente ocasionado por infinitas combinaciones de valores de los factores experimentales.

Fuentes: [38,39,40]

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental desarrollada contempla dos etapas principales: la destrucción de la pared celular de las microalgas y la extracción del aceite con base en el método propuesto por *Bligh & Dyer* [6], complementada con la caracterización de extractos lipídicos obtenidos (Figura 1).

**Figura 1.** Metodología experimental desarrollada.



Fuente: Autores

### 2.1. MATERIALES

**2.1.1. Reactivos.** Para la etapa de disrupción celular los reactivos utilizados fueron: metanol, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico. Mientras que para la etapa de extracción se usaron metanol y cloroformo como solventes. Además durante todo el proceso de experimentación se empleó agua destilada. En el ANEXO C se muestra una tabla con las características de los reactivos utilizados.

**2.1.2. Biomasa de microalgas.** Las especies de microalgas utilizadas fueron suministradas por la Corporación Instituto de Morrosquillo (punta Bolívar, Colombia), su cultivo se realizó en estanques abiertos, se cosecharon por floculación, secadas al sol y refrigeradas hasta su utilización; las especies trabajadas fueron:

- *Closterium* 200 ppm  $Al_2(SO_4)_3$ : Empleada para determinar la relación biomasa/solvente.

- *Closterium* de agua dulce: Utilizada en el diseño experimental y optimización del método de extracción.
- *Guinardia*: Usada para seleccionar el mejor pretratamiento.
- *Amphiprora*: Empleada para verificar la influencia del pretratamiento en la extracción.

Adicionalmente, el Instituto Colombiano del Petróleo suministró las especies *Nannocloropsis*, cosechada por floculación y secada hasta su utilización, y *Botryococcus braunii*, la cual fue secada por liofilización. Estas especies fueron empleadas para determinar la influencia de la adición de agua en la primera agitación.

Se usaron distintas especies de microalgas en diferentes partes del desarrollo experimental debido a la no disponibilidad de biomasa lo cual generó, resultados poco rígidos. Sin embargo, este trabajo brinda una primera aproximación de la implementación del método de *Bligh & Dyer* [6] a un grupo heterogéneo de especies de microalgas nativas dentro del proyecto “Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel”.

## **2.2. EQUIPOS**

Los principales equipos utilizados fueron:

- Autoclave esterilizadora eléctrica marca All American Modelo 25X con una presión máxima de 20 Psi y 259 °F.
- Balanza analítica de marca precisa modelo XB220A, precisión  $\pm 0,0001g$ .
- Ultraturrax Heidolph D-91126 Schwabach 5000-26000 rpm.
- Bomba de vacío Emerson HP 1/6 .
- Centrifuga *PowerSpin* TM modelo MX 8624 marca UNICO.
- Destilador MonoDest 3000 marca BRAND Premium Hotplate Stirrer MSH-20D, 110 V.

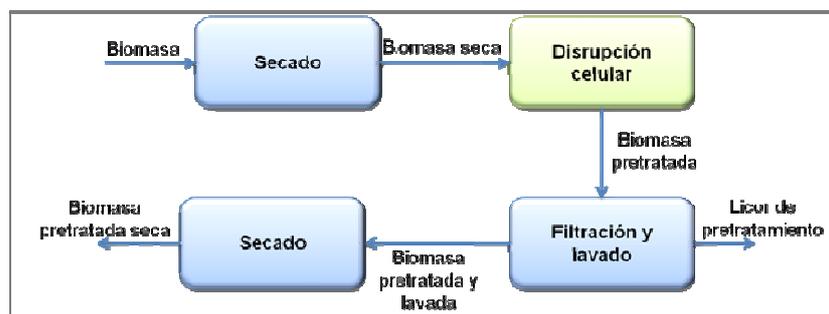
- Manta de calentamiento capacidad 500 mL, 200 V.

En el ANEXO D se puede observar fotografías de los principales equipos utilizados.

## 2.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

**2.3.1. Disrupción celular.** La materia prima suministrada se sometió al proceso mostrado en la Figura 2. Donde la biomasa fue secada por calentamiento eléctrico para su posterior disrupción celular. La biomasa sometida a lisis celular se filtró al vacío y se lavó con abundante agua destilada para eliminar los residuos de ácido y por último se secó nuevamente. Se evaluaron dos métodos de disrupción celular: pretratamiento organosolv e hidrólisis ácida.

**Figura 2.** Diagrama de bloques del proceso de disrupción celular aplicado.



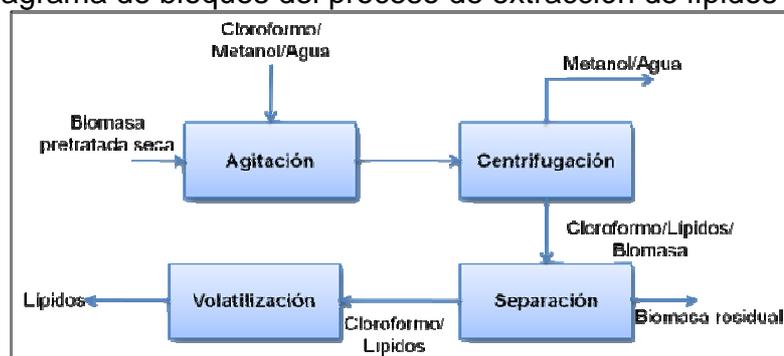
Fuente: Autores

**2.3.1.1. Pretratamiento organosolv.** Se preparó una solución metanol 3,32 [%v/v], y ácido sulfúrico [0,6 M], se le agregó la biomasa y se sometió a autoclave durante 247 minutos a 121°C [41].

**2.3.1.2. Hidrólisis ácida.** Se preparó una solución de ácido clorhídrico [0,5M], se le agregó la biomasa y se agitó a 500 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos.

**2.3.1.3. Extracción.** Las condiciones de operación del método de extracción de *Bligh & Dyer* expuestas en la Tabla 1 se modificaron para adaptarlo a la extracción de aceite de microalgas nativas (Figura 3), en cada etapa se variaron las condiciones de operación con el fin de aumentar la eficiencia de la extracción. En el ANEXO E se muestran fotografías correspondientes al desarrollo experimental del proceso de extracción.

**Figura 3.** Diagrama de bloques del proceso de extracción de lípidos aplicado.



Fuente: Autores

**2.3.1.4. Agitación.** En esta etapa se evaluaron dos proporciones de biomasa/solvente 1:10 [6, 7, 36] y 1:20 con base en los resultados de las pruebas preliminares, además el efecto de la adición de agua en la primera agitación, así como el efecto del tiempo y la frecuencia de homogenización, según un diseño experimental.

**2.3.1.5. Centrifugación.** Se evaluó la máxima frecuencia reportada por la literatura (2500 rpm) [36] y la máxima permitida por el equipo disponible en el laboratorio (3400 rpm). Para todos los experimentos el tiempo de centrifugación fue de 15 minutos.

**2.3.1.6. Separación.** Con el fin de evitar la propagación de la biomasa residual en las fases separadas por centrifugación, la mezcla metanol-agua (fase

superior), se extrajo de los tubos de centrifuga con un gotero y se cuantificó en una probeta. Mientras que la fase lipídica con presencia de biomasa se filtró por gravedad. Además fue necesario lavar con cloroformo los tubos de centrifuga para disminuir la biomasa retenida en esta etapa.

**2.3.1.7. Volatilización.** Aunque la literatura reporta la destilación como el mecanismo para la recuperación de solvente, para este trabajo la separación solvente-extracto se hizo por volatilización hasta peso constante debido a los pequeños volúmenes trabajados en cada experimento. Para cada prueba de extracción se realizaron como mínimo dos replicas con el fin de dar reproducibilidad a los resultados.

**2.3.2. Diseño experimental para la obtención de las mejores condiciones de agitación.** Se realizó un diseño experimental  $2^2$  con un punto central para estudiar como un cambio de tiempo y/o frecuencia en la etapa de agitación afectan el rendimiento de la extracción, así como para disminuir el número de experimentos y el consumo de biomasa y reactivos. Se realizó una réplica de cada combinación arrojada por el diseño experimental con el fin de robustecer los resultados comparando datos obtenidos entre los diferentes niveles y datos obtenidos de una misma combinación. Luego de cuantificar los extractos lipídicos, estos se analizaron con ayuda de algunas herramientas estadísticas proporcionadas por los programas computacionales STATISTICA 7.0 y STATGRAPHICS PLUS.

**2.3.3. Caracterización de las muestras.** Los extractos lipídicos fueron clasificados según la especie de microalga y el método de lisis celular aplicado, para su posterior caracterización mediante cromatografía de gases “Análisis de FAMES” (*Fatty Acid Methyl Esters*) a cargo del Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL.

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 3.1. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

La estandarización del método de extracción de *Bligh & Dyer* realizada con las especies de microalgas trabajadas mostró los siguientes resultados:

**3.1.1. Efecto de la frecuencia de centrifugación sobre la separación de las fases.** La centrifugación a 2500 rpm no separó totalmente las fases mientras que a 3400 rpm se logró identificar el sistema bifásico formado por una fase superior metanol-agua e inferior cloroformo-lípidos. Por esta razón, se decidió realizar las pruebas posteriores centrifugando a 3400 rpm durante 15 minutos.

**3.1.2. Efecto de la relación biomasa/solvente.** Para la relación biomasa/solvente 1:10 no se completó la filtración debido a que la velocidad de volatilización del cloroformo fue mayor a la velocidad de filtración de la mezcla, quedando toda la biomasa retenida en esta etapa sin obtener ningún extracto. Por otra parte, al realizar la extracción utilizando una relación biomasa/solvente de 1:20 se superó este inconveniente por lo cual se seleccionó esta relación para realizar las pruebas posteriores.

**3.1.3. Efecto de la adición de agua al inicio de la agitación.** La Tabla 3 muestra el porcentaje de extracto obtenido para dos especies de microalgas con y sin adición de agua en la primera parte de la etapa de agitación, en donde se puede observar que la adición de agua disminuyó el porcentaje de extracción para la especie *Botryococcus braunii* y *Nannochloropsis* en un 15 y 40% respectivamente. Esto se debe a que el agua es soluble con el metanol e insoluble con el cloroformo y los lípidos afectando la solubilidad entre el cloroformo y el metanol, dificultando la extracción de los lípidos. Con base en estos resultados se decidió que para la adaptación de la metodología *Bligh & Dyer* a la extracción de lípidos de biomasa

de microalgas no es conveniente adicionar agua en la primera parte de la agitación. Para estas pruebas la relación biomasa/ agua se mantuvo en 1/3,2.

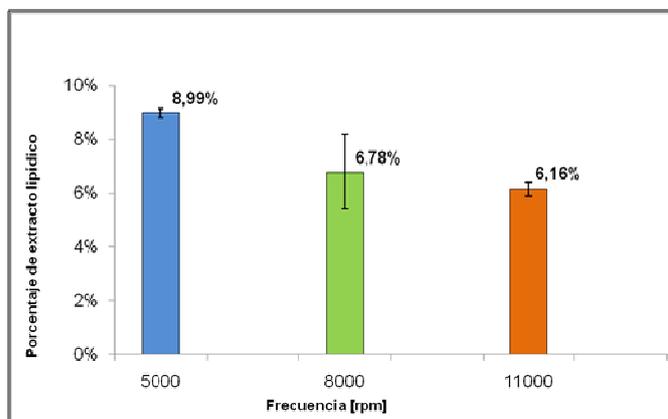
**Tabla 3.** Resultados del efecto de adicionar agua en la primera parte de la agitación.

Especie	Peso de la muestra [g]	Agua [ml]	% Extracto lipídico
<i>Botryococcus Braunii</i>	5	–	5,6
	5	16	4,74
<i>Nanocloropsis</i>	3,5	–	1,45
	10	32	0,89

Fuente: Autores

**3.1.4. Efecto de la frecuencia de agitación.** Para esta etapa de la metodología se realizó una ruptura celular mediante pretratamiento organosolv a la especie *Closterium* y la extracción se llevó a cabo homogenizando la mezcla biomasa/solvente durante 14 minutos a frecuencias de 5000, 8000 y 11000 rpm.

**Figura 4.** Efecto de la frecuencia de agitación sobre el porcentaje de extracción.



Fuente: Autores

En la Figura 4 se observa que un aumento en la frecuencia de agitación disminuye el porcentaje de extracto lipídico, este resultado coincide con lo reportado por Cravotto y colaboradores [42], quienes evaluaron la extracción asistida con ultrasonido aplicando frecuencias entre 19-300 kHz. obteniendo mayores rendimientos de extracción a bajas frecuencias. Por lo tanto se decidió efectuar un

diseño experimental para analizar conjuntamente las variables tiempo y frecuencia de agitación.

### 3.1.5. Estudio estadístico del efecto del tiempo y la frecuencia de agitación.

Se evaluó un diseño experimental  $2^2$  con un punto central. Las variables estudiadas fueron: la sumatoria de tiempos en la homogenización [minutos] y la frecuencia de agitación [rpm]. En la Tabla 4 se presentan los valores de los niveles seleccionados para cada una de las variables del diseño experimental.

**Tabla 4.** Valores y niveles de las variables estudiadas.

FACTORES	NIVELES		
	-1	0	1
$\Sigma$ Tiempos [minutos]	14	23	32
Frecuencia [rpm]	5000	8000	11000

Fuente: Autores

La matriz de diseño experimental y sus respectivos porcentajes de extracto lipídico obtenidos se muestran en la Tabla 5. Los mejores resultados se encuentran al nivel más bajo de cada variable y corresponden a los experimentos 1 y 6.

**Tabla 5.** Matriz del diseño experimental con porcentajes de extracto lipídico obtenidos durante la extracción.

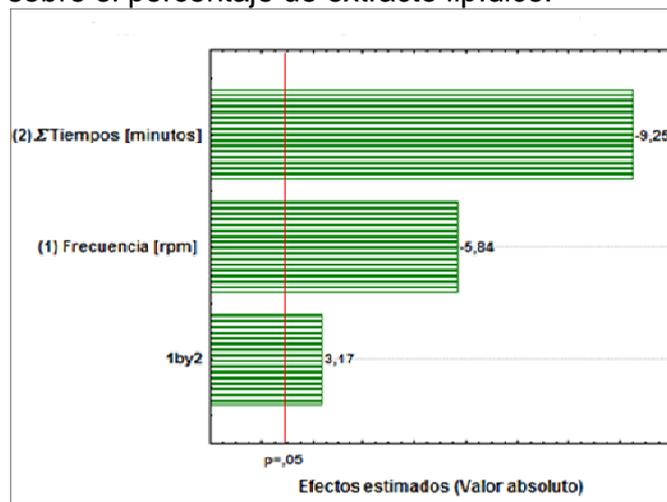
N° Experimento	Frecuencia	$\Sigma$ Tiempo	% Extracto lipídico
1	-1	-1	9,13
2	1	-1	6,34
3	-1	1	5,30
4	1	1	4,46
5	0	0	6,43
6	-1	-1	8,86
7	1	-1	5,98
8	-1	1	4,87
9	1	1	4,03
10	0	0	5,21

Fuente: Autores

**3.1.5.1. Análisis de la interacción entre el tiempo de homogenización y la frecuencia de agitación.** El diagrama de Pareto (Figura 5) muestra que las variables tiempo, frecuencia y su interacción, presentan efectos significativos sobre la etapa de extracción debido a que todos los bloques pasan el umbral (línea roja). Además, se puede inferir que las variables tiempo y frecuencia en la etapa de agitación presentan efectos negativos sobre el rendimiento de la extracción de lípidos de microalgas, siendo el tiempo el factor que más afecta negativamente la variable de respuesta. Y por último cabe destacar que la combinación entre las variables independientes (tiempo, frecuencia) tiene un efecto positivo sobre la variable de respuesta estudiada.

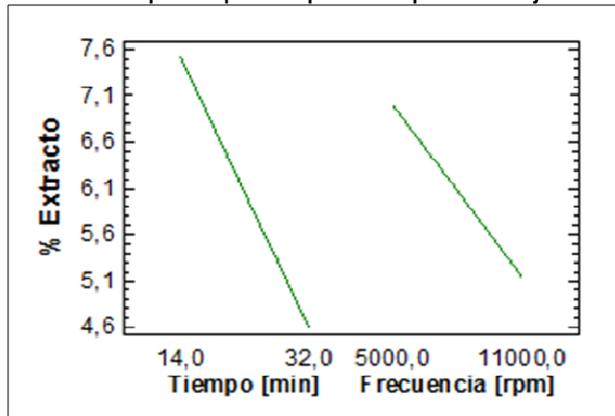
Como complemento, se ilustra en la Figura 6 un análisis cuantitativo del efecto de las variables estudiadas sobre el porcentaje de extracto, donde se verifica, que el tiempo es el factor más influyente en el rendimiento de la extracción, encontrando que a menores tiempos de agitación (14 minutos) se obtienen mayores porcentajes de extracción (7-7,6%). Mientras que trabajando a frecuencias de 5000 rpm se logra (6,6-7%).

**Figura 5.** Diagrama de Pareto. Efecto de la frecuencia de homogenización y tiempo de agitación sobre el porcentaje de extracto lipídico.



Fuente: Autores

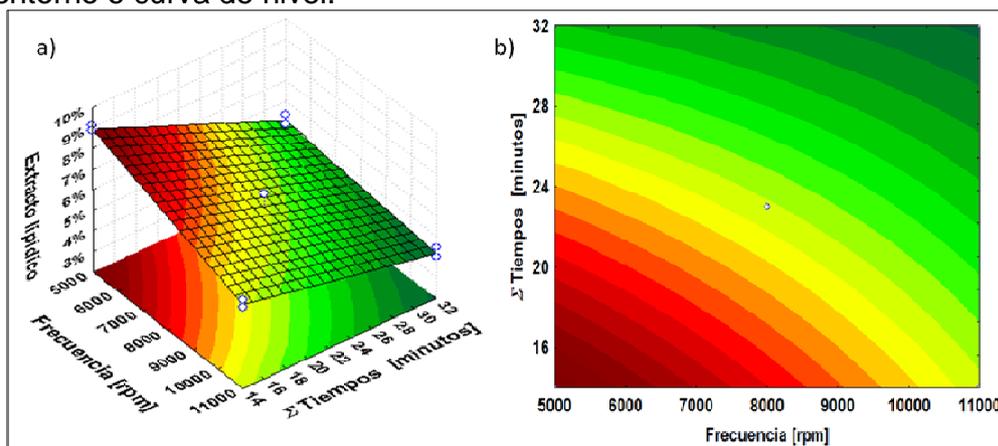
**Figura 6.** Gráfico de efectos principales para el porcentaje de extracto lipídico.



Fuente: Autores

La interacción entre el tiempo y la frecuencia de agitación se puede ver claramente en la Figura 7 donde la superficie y curva de nivel presentan una región con mayor y otra con menor porcentaje de extracto lipídico denotadas por las zonas de color rojo y verde respectivamente. Encontrando entonces, que el porcentaje de extracto lipídico se maximiza cuando las variables tiempo y frecuencia de agitación se encuentran en el nivel más bajo dentro de la región experimentada, es decir 14 minutos y 5000 rpm.

**Figura 7.** Efecto de frecuencia de homogenización y tiempo de agitación sobre el porcentaje de extracto lipídico. a) Diagrama superficie de respuesta b) Diagrama de contorno o curva de nivel.

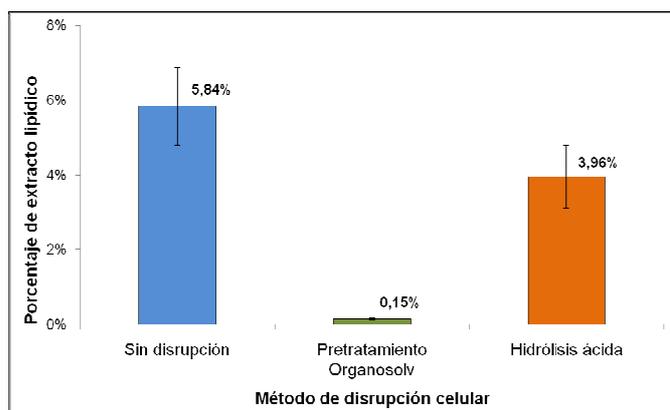


Fuente: Autores

Con base en los resultados mostrados hasta esta instancia se puede concluir que las mejores condiciones para adaptar el método *Bligh & Dyer* a la extracción de lípidos de microalgas nativas son: trabajar una relación biomasa/solvente de 1:20, agitar a 5000 rpm durante 10 minutos, no agregar agua en la primera parte de la agitación y centrifugar a 3400 rpm durante 15 minutos. En el ANEXO F se propone un protocolo para la aplicación de este método.

**3.1.6. Efecto del método de disrupción celular.** Para la especie *Guinardia* se evaluaron dos métodos de disrupción celular: hidrólisis ácida y pretratamiento organosolv (Figura 8) donde se observa, que estos métodos no incrementaron el porcentaje de extracto lipídico.

**Figura 8.** Efecto de la disrupción celular sobre el porcentaje de extracción para la especie *Guinardia* a las condiciones óptimas de extracción.

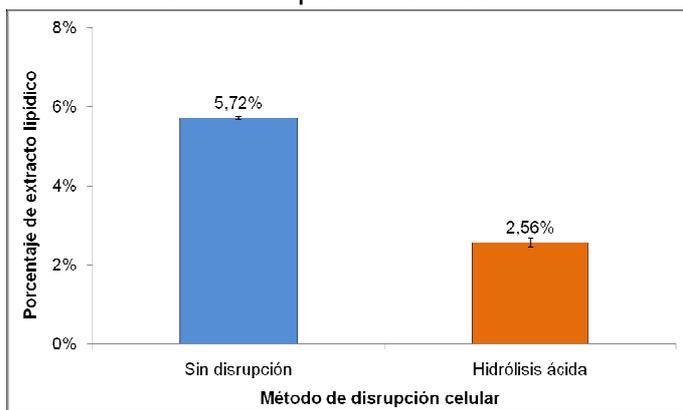


Fuente: Autores.

Con base en estos resultados el pretratamiento organosolv se descartó para pruebas posteriores debido a los bajos porcentajes de extractos lipídicos obtenidos y a la dificultad en el desarrollo de la extracción. Mientras que la disrupción celular con hidrólisis ácida aunque reportó una disminución del 32% en el rendimiento continuó siendo objeto de estudio debido a que facilitó las etapas de centrifugación y filtración durante la extracción. Luego se realizaron nuevas pruebas aplicando hidrólisis ácida a la especie *Amphiprora* (Figura 9) con el fin de

verificar que el efecto negativo de este método continuaba para otra especie obteniendo una disminución del 55% en el rendimiento de la extracción. Los porcentajes de extracto lipídico se calcularon en base a la biomasa antes de realizar la disrupción celular.

**Figura 9.** Efecto de la disrupción celular sobre el porcentaje de extracción para la especie *Amphiprora* a las condiciones óptimas de extracción.



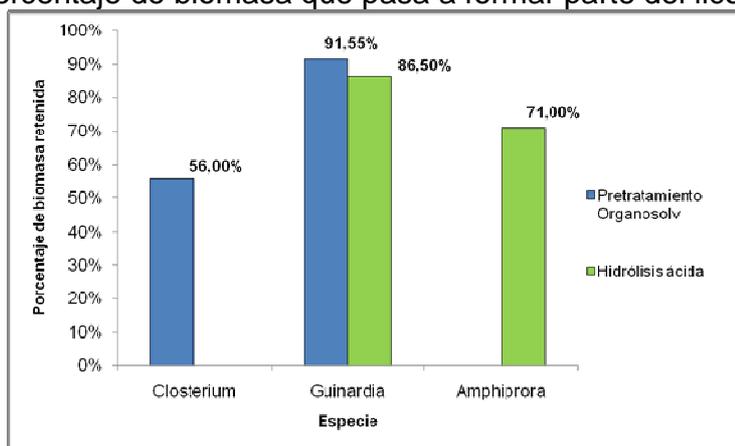
Fuente: Autores

Los bajos rendimientos de extracción empleando biomasa con disrupción celular respecto a biomasa sin disrupción celular se deben a que el método de extracción *Bligh & Dyer* en particular, extrae además de lípidos, cantidades significativas de componentes no lipídicos [26]. Al aplicar previamente un método de disrupción celular estos componentes no lipídicos pasan a formar parte del licor de hidrólisis permitiendo obtener un extracto lipídico más puro en comparación con la extracción empleando biomasa sin disrupción celular. Es decir, que la aplicación de un método de disrupción celular permite obtener extractos más puros luego de realizar la extracción de lípidos con el método *Bligh & Dyer* aunque se obtengan menores porcentajes de extracción.

**3.1.6.1. Efecto del método de disrupción celular sobre la separación de componentes de la biomasa de microalgas.** Teniendo en cuenta que la pared celular de las microalgas se destruye por la degradación de los polisacáridos

presentes en la biomasa, y que estos y otros componentes de la matriz sólida son solubles en el licor de hidrólisis, un gran porcentaje de la biomasa sometida al proceso de lisis celular pasa a formar parte de este licor, disminuyendo la biomasa sometida a extracción.

**Figura 10.** Porcentaje de biomasa que pasa a formar parte del licor de lisis celular.



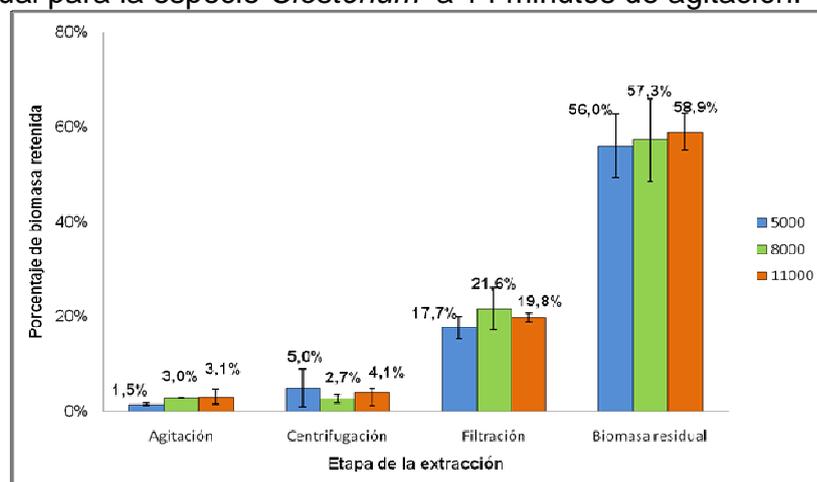
Fuente: Autores

El porcentaje de biomasa que pasa a formar parte del licor después de la etapa de lisis o disrupción celular se muestra en la Figura 10 donde se observa que la fracción másica de los componentes hidrosolubles en el licor de hidrólisis varía según la especie de microalga, por ejemplo para el caso de la especie *Guinardia* el porcentaje de biomasa que pasa a formar parte del licor de hidrólisis es mayor con pretratamiento organosolv en comparación a hidrólisis ácida.

**3.1.7. Retención de biomasa por etapa durante el desarrollo de la metodología de extracción.** La retención de biomasa en las etapas de agitación, centrifugación y filtración, se debe a la adherencia de esta en los instrumentos utilizados para realizar la extracción y cuya recuperación implicaría el gasto excesivo de solvente tóxico; mientras que la biomasa residual corresponde a aquella que es recuperada después de la etapa de filtración. En la Figura 11, se observa que el porcentaje de biomasa retenida en las etapas de agitación y

centrifugación es poco significativo con respecto a la biomasa residual y la biomasa retenida en la etapa de filtración. Además, la retención de biomasa en las etapas de la metodología son similares en el rango de frecuencia de agitación trabajado y al realizar la homogenización a 5000 rpm la retención de biomasa en la agitación es menor. En el ANEXO G y ANEXO H se puede observar las evidencias de la retención de biomasa en los instrumentos utilizados y la biomasa residual obtenida al final de la extracción.

**Figura 11.** Biomasa retenida en cada etapa de la metodología de extracción y biomasa residual para la especie *Closterium* a 14 minutos de agitación.

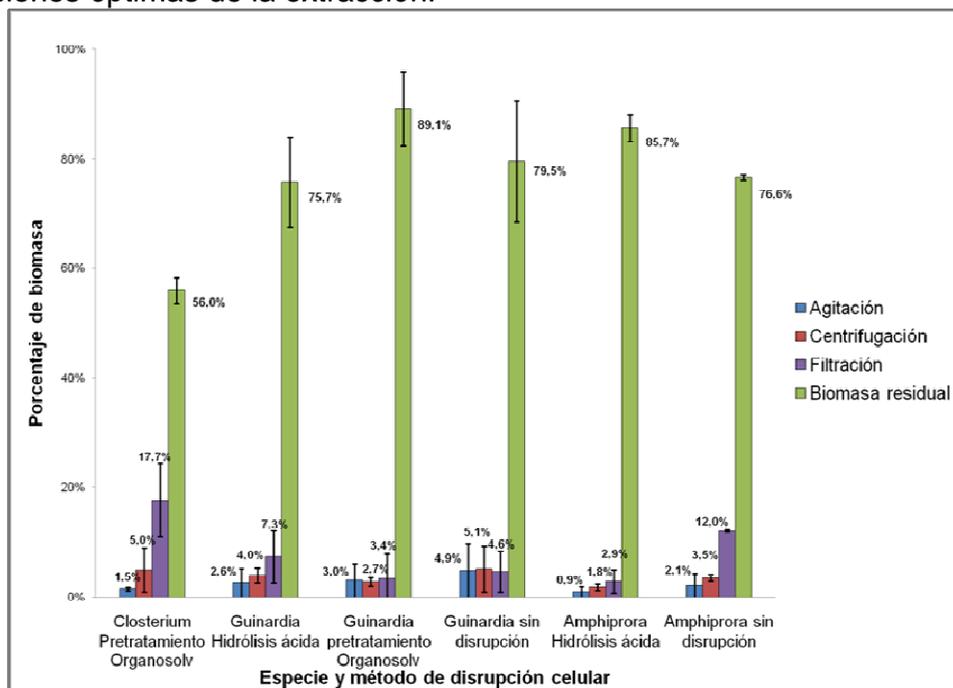


Fuente: Autores

**3.1.8. Retención de biomasa según especie y método de ruptura celular utilizado.** La biomasa retenida en cada etapa de la extracción y la biomasa residual varía según la especie y el método de ruptura celular aplicado. En la Figura 12 se refleja que el promedio de biomasa residual se encuentra en un rango entre 55-90%. Además los porcentajes de biomasa retenida en las etapas de agitación, centrifugación y filtración fueron significativamente inferiores respecto a la biomasa residual. Las etapas de agitación, centrifugación y filtración reportaron en promedio porcentajes del 2,5%, 3,7% y 8% de biomasa retenida en estas etapas respectivamente. De esta manera, se puede concluir que aunque el

método de extracción de lípidos *Bligh & Dyer* contempla varias etapas no se generan pérdidas significativas de biomasa por manipulación de instrumentos.

**Figura 12.** Biomasa retenida en cada etapa de la metodología de extracción y biomasa residual para las especies *Closterium*, *Guinardia* y *Amphiprora* a las condiciones óptimas de la extracción.



Fuente: Autores

### 3.2. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS LIPÍDICOS.

**3.2.1. Rendimiento de la extracción *Bligh & Dyer*\***. Los rendimientos de la extracción que se muestran en la Tabla 6 se calcularon con base a los porcentajes lipídicos reportados por el ICP-ECOPETROL para cada especie de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\% \text{ ICP} - \% \text{ Bligh \& Dyer}^*}{\% \text{ ICP}}$$

La especie *Nannocloropsis* presentó el rendimiento más bajo, *Closterium*, *Amphiprora* y *Botryococcus* se acercaron a un rendimiento del 50% y los mejores resultados se obtuvieron con *Guinardia*. Este alto rendimiento fue consecuencia de la rápida separación entre el extracto lipídico y el sólido en la etapa de filtración.

**Tabla 6.** Rendimiento de la extracción *Bligh & Dyer*\* respecto al extracto lipídico obtenido por el ICP-ECOPETROL.

Especie	% Extracto lipídico		Rendimiento
	ICP	<i>Bligh &amp; Dyer</i> *	
<i>Nannocloropsis</i>	11,2%	1,45%	13%
<i>Closterium</i>	22,1%	9,11%	41%
<i>Botryococcus braunii</i>	15%	5,6%	37%
<i>Guinardia</i>	6,7%	5,84%	87%
<i>Amphiprora</i>	12%	5,74%	48%

\* Método adaptado por los autores.

Fuente: Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL y autores

**3.2.2. Caracterización de los extractos lipídicos.** Algunos de los extractos lipídicos que fueron enviados para caracterización al Instituto Colombiano de Petróleo ICP-ECOPETROL se muestran en el ANEXO I. Los cromatogramas de los análisis de FAMES (*Fatty Acid Methyl Esters*) de los extractos lipídicos de las especies *Botryococcus braunii* y *Nannocloropsis* se muestran en el ANEXO J. El cromatógrafo utilizado para la caracterización fue un Agilent 7890 con una columna DB5-HT de longitud 15 m y un detector de ionización de llama (FID).

En el perfil de los ácidos grasos para las especies *Botryococcus braunii* y *Nannocloropsis* (Tabla 7) se observa que el método *Bligh & Dyer* extrae ácidos grasos saturados e insaturados, así como grasos comunes en aceites vegetales y animales; ácidos grasos poco comunes y ácidos grasos esenciales (AGE) poliinsaturados comúnmente llamados omega-3 (Linolénico), omega-6 (Linoléico) y omega-9 (Oléico). También se muestra que el 34.6 % y 12,5% para las especies *Botryococcus braunii* y *Nannocloropsis* corresponden respectivamente al

porcentaje de área de acilglicerol presentes en los extractos lipídicos. Estos acilglicerol pueden ser aptos para la producción de biocombustibles.

**Tabla 7.** Perfil de ácidos grasos presentes en las especies *Botryococcus braunii* y *Nannochloropsis*.

ÁCIDO GRASO		Especie		Tipo de ácido graso			
Nomenclatura	Nombre	<i>Botryococcus braunii</i>	<i>Nannochloropsis</i>				
C6:0	Hexanoico	30,30%	0,00%	■		■	
C8:0	Octanoico	0,90%	0,00%	■			
C10:0	Decanoico	0,50%	0,00%	■			
C11:0	Undecanoico	2,40%	0,00%	■			
C12:0	Láurico	0,80%	0,00%	■			
C13:0	Tridecanoico	0,40%	0,00%	■			
C14:0	Mirístico	0,00%	21,30%	■	■		
C15:0	Pentadecanoico	1,30%	1,70%	■			
C15:1n10c	Pentadecenoico	6,60%	4,20%		■		
C16:0	Palmitico	0,60%	7,90%	■	■		
C17:0	heptadecanoico	0,80%	21,60%	■			
C18:1	Oléico	1,70%	1,80%		■	■	■
C18:1n9t	Elaidico	0,60%	0,00%		■		
C18:2	Linoléico	40,30%	23,80%	■	■	■	■
C18:3	Gamma-Linolénico	0,70%	2,00%	■	■	■	■
C18:3	Linolénico	1,10%	0,00%	■	■	■	■
C20:0	Araquidico	0,70%	0,00%		■		■
C20:1	Gadoleico	0,60%	0,70%				
C20:2n11,14c	Eicosanodioico	4,20%	0,00%	■			
C21:0	Heneicosanoico	0,50%	0,60%	■			
C20:3	Eicosatrienoico	1,00%	0,00%				
C20:5	Eicosapentaenoico	0,80%	0,00%			■	■
C22:0	Behenico	0,40%	0,00%	■			■
C22:2	Docosadienoico	0,80%	1,00%		■		
C24:0	Lignocérico	0,40%	6,80%		■		■
C24:1	Eicosapentanoico	0,20%	3,50%		■		
C24:1	Nervónico	0,40%	3,00%		■		
Total FA, %		100%	100%				
Acilglicerol, %área		34,60%	12,50%				

Tipo de ácido graso	
Ácidos grasos saturados	■
Ácidos grasos insaturados	■
Ácidos grasos encontrados en especies vegetales	■
Ácidos grasos encontrados en especies animales	■
Ácidos grasos poco comunes	■
Ácidos grasos esenciales	■

Fuente: Instituto Colombiano del petróleo ICP-ECOPETROL y Autores

## CONCLUSIONES

El método *Bligh & Dyer* se adaptó a la extracción de lípidos de microalgas nativas, donde las mejores condiciones de operación fueron: relación biomasa/solvente 1:20, frecuencia de homogenización 5000 rpm, tiempo total de homogenización 14 minutos, frecuencia y tiempo de centrifugación 3400 rpm y 15 minutos respectivamente.

La adición de agua en la primera parte de la agitación facilita la filtración pero disminuye el porcentaje de extracción de aceite en un rango entre 15-40% dependiendo de la especie de microalga trabajada.

El análisis del diseño experimental mostró que las variables estudiadas (tiempo y frecuencia de agitación) influyen significativamente en los porcentajes de extracto lipídico, encontrando que este se maximiza cuando la extracción se lleva a cabo a bajas frecuencias (5000 rpm) y cortos tiempos de agitación (14 minutos).

La hidrólisis celular como método de ruptura celular permite obtener extractos lipídicos más ricos en lípidos luego de realizar la extracción con la metodología estandarizada, aunque se desfavorece significativamente el porcentaje total de extracto lipídico en un rango entre el 32 y 55%.

La biomasa retenida en las etapas de la metodología de extracción reportaron porcentajes poco significativos (2,5–8%) respecto a la biomasa residual (55-90%). Con esto se puede decir que el método *Bligh & Dyer* no genera grandes pérdidas de biomasa causadas por la manipulación de los instrumentos.

El análisis de FAMES mostró que la especie *Botryococcus braunii* contiene mayor porcentaje de área de acilglicerol (34,6%) aptos para la producción de biodiesel en comparación con la especie *Nannochloropsis* (12,5%).

## RECOMENDACIONES

Evaluar otros métodos de disrupción celular como ultrasonido ó microondas, en combinación con la metodología planteada que puedan incrementar la pureza del extracto y el rendimiento de la extracción.

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

Evaluar otras técnicas de filtración como filtración al vacío o membranas con el fin de incrementar la pureza del extracto lipídico.

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

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] DEMIRBAS, Ayhan. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. En: Energy Conversion and Management. 2008, Vol. 49, p. 2106-2116.
- [2] MAJER, Stefan, MUELLER-LANGER Franziska, ZELLER, Vanessa, KALTSCHMITT, Martin. Implications of biodiesel production and utilization on global climate - a literature review. En: European Journal of Lipid Science Technology. 2009, Vol. 111, p. 747-762.
- [3] SCHENK, Peer, THOMAS-HALL, Skye, STEPHEN, Evan, MARX, Ute, MUSSGNUG, Jan, POSTEN, Clemens, KRUSE, Olaf, HANKAMER, Ben. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. En: *Bioenergy Research*. 2008, Vol. 1, p. 20-43.
- [4] ROSENBERG, Julian, OYLERL, George A., WILKINSON, Loy, BETENBAUGH, Michael. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. En: Current Opinion in Biotechnology. 2008. Vol. 19, p. 430-436.
- [5] CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. En: Biotechnology Advances. 2007, Vol. 25, pp. 294–306.
- [6] BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. En: Journal Biochemical Physiology. Vol. 37. 1959, p. 911-917.

- [7] DOMINGUEZ, Adolfo. FÁBREGAS, Jaime y OTERO, Ana. Astaxantina, el oro rojo de la microalga Haematococcus Pluviales. En: Algas: Boletín Española de ficología. 2006 p. 160-167.
- [8] SINGH NIGAM, Poonam and SINGH, Anoop. Production of liquid biofuels from renewable resources. En: Progress in Energy and combustion Science. 2010, p. 1-17.
- [9] CARDONA, Carlos Ariel y OTERO, Carlos Eduardo. Avances investigativos en la producción de biocombustibles. (Editores) Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales. 2009., p. 43-52.
- [10] LORENZ, Todd, CYSEWSKA, Gerald. Commercial potential for Haematococcus microalgae as natural source of Astaxantin. En: Trends in Biotchnology. 2000. Vol. 18, p.160-167.
- [11] SARABHAI, B., ARORA, C. Textbook of algae. 1 ed. New Delhi. 1995. En: Closterium. P. 233-235.
- [12] COHEN, Zvi. Chemical from microalgae. Washington: British Library. 1999, p. 47, 205 y 210.
- [13] EOL, Enciclopedia of life. [Base de datos en línea]. [Consultado el 12 de Jul. 2010]. Disponible en: - <http://www.eol.org/pages/911566->.
- [14] PERALTA, Patricia y FUENTES, Verónica. Fitobentos, fitoplancton y zooplancton litoral del bañado de Carilauquen, Cuenca de Llanquanelo, Mendoza, Argentina. En: Asociación Española de Limnología, España. 2005. Vol. 24, p. 183-198.

- [15] WILLIAMS, J. P. Culture methods and growth measurements. En: Glicerolipids and fatty acids of algae. 1 ed. University of Cambridge. p. 101-107.
- [16] VELÁZQUEZ, Gladys. Fundamentos de alimentación saludable. En Lípidos: esenciales para la salud. 1 ed. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia. 2006, p. 46-47.
- [17] BAILEY, Alton E. Aceites y grasas industriales. En: Naturaleza de los aceites y grasas. 1 ed. Reverté. 1984. p. 4.
- [18] MOLINA G., E. ACIÉN F., F. G. and ROBLES M., A. Downstream Processing of Cell-mass and Products. En: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. 2004. p. 215-252.
- [19] GONZÁLEZ, Angel D., KAFAROV, Viatcheslav, GUZMÁN M., Alexander. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. En: Prospect. 2009 Vol. 7, p. 53-60.
- [20] LEE, J-Y et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. En: Bioresource Technology. 2009. p. 1-3.
- [21] MIDDELBERG, Anton. Process-Scale Disruption o Microorganisms. En: Biotechnology Advances. 1995. Vol. 13, p. 491-551.
- [22] ENGLER, C.R., Disruption of Microbial Cells, in Comprehensive Biotechnology. Vol. 2. Oxford, England .M. Moo-Young, Editor, 1985, p. 305.
- [23] PEÑA, Antonio. Bioquímica. 2 ed. México D.C. Limusa S.A, 2004, p. 143-145.

[24] GECIOVA, Jana, BURY, Dean, JELEN, Paul. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry. En: International dairy Journal. 2001. Vol. 12, p. 541-553.

[25] MANIRAKIZA, P., COVACI, A. and SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using soxhlet, Roese- Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods. En: Journal of Food Composition and Analysis. 2001 Vol. 14, p. 93-100.

[26] LEE, Seog J., YOON, Beyung-Dae and OH, Hee-Mock. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *En*: Biotechnonology Techniques. Vol. 12. 1998, p. 553- 556.

[27] DODDS, Eric D., MCCOY, Mark R., GELDENHUYS, Adeline, REA, Lorrie D. and KENNISH, Jhon M. Microscale recovery of total lipids from fish tissue by accelerated solvent extraction. En: Journal of the American Oil Chemists Society, Vol. 81. 2004, p. 835-840.

[28] FOLCH, J., LEES, M. & STANLEY, G. H. S.1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. En: Journal Biological Chemistry Vol. 226. 1956, p. 497-509.

[29] MOLINA G., E, ROBLES M., A, Giménez G., A, SÁNCHEZ P., J A, GARCÍA C., F and GARCÍA S. J. L. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. En: Journal of the American Oil Chemists Society. Vol. 71. 1994, p. 955-959.

[30] CHRISTIE, W.W. Preparation of lipid extracts from tissues. En: Advances in Lipid Methodology. Vol. 2. 1993, p. 195-213.

- [31] GARCÍA R., J. A. y DÍAZ, IRTA. Nuevas tendencias en el análisis de ácidos grasos. Centro de Tecnología de la Carne. Unidad de Química Alimentaria. Granja Camps i Armet. 17121.
- [32] METHEREL, Adam H., TAHA, Ameer Y., IZADI, Hamid and STARK, Ken D. The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (Flaxseed). En: Prostaglandins, Leukotrienes and essential Fatty Acids. Vol. 81. 2009, p 417-423.
- [33] IVERSON, Sara J., LANG, Shelley L. and COOPER M., Margaret. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a board rang of marine tissue. En: Lipids. Vol. 36. 2001, p. 1283-1287.
- [34] ZHU, M., ZHOU, P.P., and YU, L. J. Extraction of lipids from Mortierella alpina and anrichment of arachidonic acid from de fungal lipids. En: Bioresurce Technology. Vol. 84. 2002, p. 93-95.
- [35] ZEPKA, L. Q, LOPES, Jacob E. y QUEIROZ, M. I. Efecto del procesamiento térmico sobre el perfil de ácidos grasos de la microalga Aphanothece microscopica Nägeli En: Ciencia y Tecnología Alimentaria Vol. 5. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos. 2007. pp. 368-371.
- [36] Determinación de grasa método Bligh and Dyer. Instituto de salud pública de Chile. Subdepartamento laboratorios del ambiente. Sección química de alimentos. PRT:701.04-156.
- [37] GUTIÉRREZ, Humberto, SALAZAR, Román. Análisis y diseño de experimentos. Segunda edición. México: Mc Graw Hill, 2004, p.384-420.

[38] CUESTA MUÑOZ, Carlos Alberto. Metodología de Superficies de Respuesta, gran alternativa para incrementar la productividad de sus procesos. Centro de ingeniería de la calidad. Cali, Colombia. p. 1-23.

[39] MASSART, D.L., VANDEGINSTE, B. G. M., BUYDENS, L. M. C., JONG, S., LEWI, P.J., SMEYERS-VERBEKE, J. Design and optimization in organic synthesis. En: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Vol. 24. 1997.

[40] VERDOY, Pablo Juan, MAHIQUES, Mateu, PELLICER, Santiago, PRADES, Raúl. Manual de control estadístico de calidad: Teoría y aplicaciones. 3 ed. Castelló de la Plana. 2006 p. 205-209.

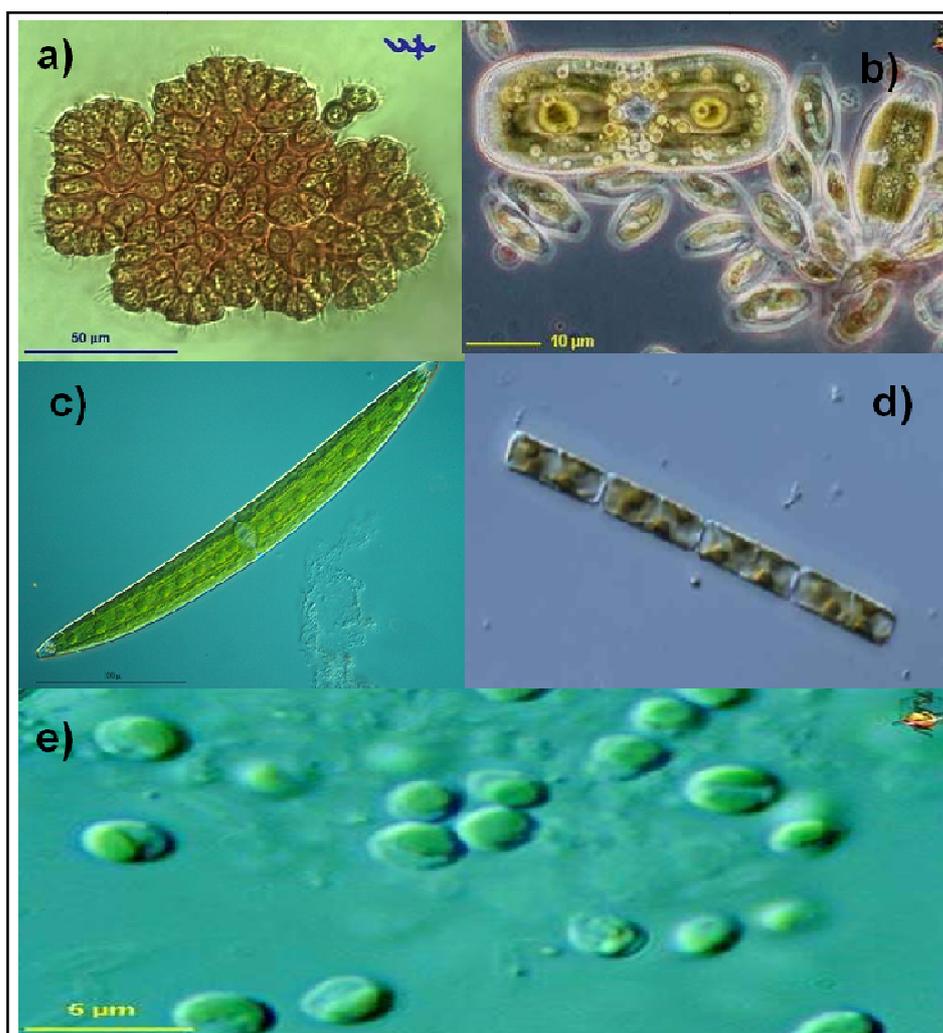
[41] JARAMILLO, María y MANTILLA, Neila. Estudio del método de pretratamiento químico etanol-NaOH para la obtención de azúcares reductores a partir de microalgas, como vía a la producción de bioetanol. Trabajo de grado ingeniero químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química, 2010.

[42] CRAVOTTO, Giancarlo, BOFFA, Luisa, MANTEGNA, Stefano, PEREGO, Patrizia, AVOGADRO, Milvio, CINTAS, Pedro. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. En: Ultrasonics sonochemistry. Vol. 15. 2008, p. 898-902.

## ANEXOS

### ANEXO A. ESPECIES DE MICROALGAS UTILIZADAS

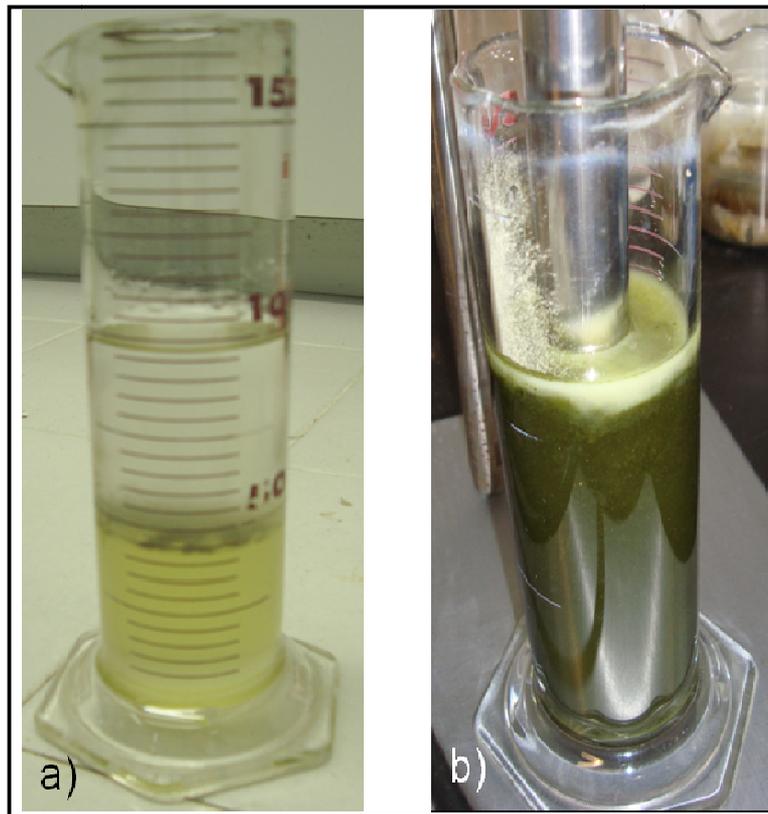
**Figura 13.** Especies de microalgas utilizadas en la parte experimental. a) *Botryococcus Braunii*, b) *Amphiprora*, c) *Closterium*, d) *Guinardia* y e) *Nannocloropsis*.



**Fuente:** EOL, Enciclopedia of life. [Base de datos en línea]. [Consultado el 12 de Jul. 2010]. Disponible en: - <http://www.eol.org/>-. NCCOS, Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research [Base de datos en línea]. [Consultado el 12 de Jul. 2010]. Disponible en: - [www.chbr.noaa.gov/pmn/\\_images/](http://www.chbr.noaa.gov/pmn/_images/)-

## ANEXO B. ACCIÓN DEL AGUA EN LA SEPARACIÓN DE LAS FASES

**Figura 14.** a) Prueba sin biomasa. b) Prueba con biomasa



Fuente: Autores.

## ANEXO C. REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN

**Tabla 8.** Principales características de los reactivos utilizados.

Reactivo	Fórmula molecular	Masa molecular [g.mol <sup>-1</sup> ]	Pureza	Punto de ebullición (°C)	Índice de polaridad
Cloroformo	CHCl <sub>3</sub>	119,38	99,9	61,05	4,1
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	32,04	99,8	64,7	5,1
Ácido Sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98,08	95	337	NA
Ácido Clorhídrico	HCl	36,46	37	48	NA

Fuentes: Varias fuentes

## ANEXO D. PRINCIPALES EQUIPOS USADOS EN LA EXPERIMENTACION

**Figura 15.** a) Autoclave esterilizadora eléctrica, b) Balanza analítica.



Fuente: Autores

**Figura 16.** Equipo para filtración al vacío.



Fuente: Autores

**Figura 17.** a) Centrífuga *PowerSpin™*, b) Ultraturrax *Heidolph*.



Fuente: Autores

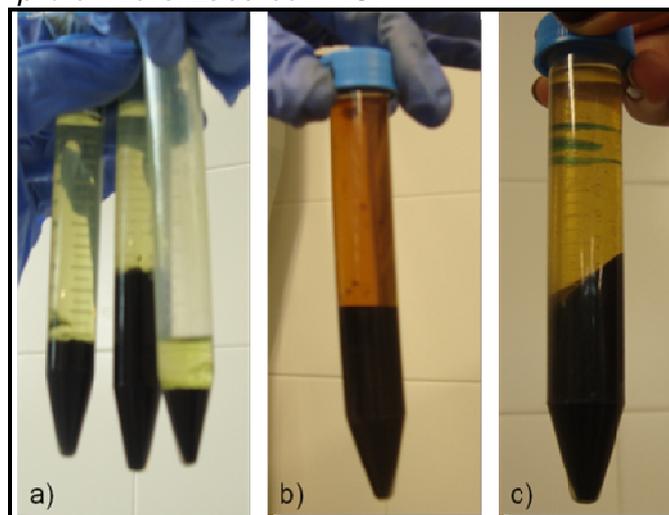
## ANEXO E. IMÁGENES DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL

**Figura 18.** Agitación. a) Primera y segunda agitación. b) Tercera agitación (adición de agua).



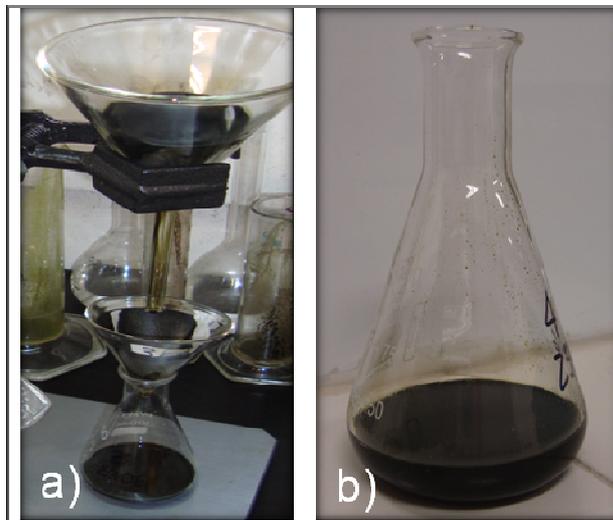
Fuente: Autores

**Figura 19.** Separación de las fases luego de la centrifugación. a) Especie *Closterium* sin interrupción celular, b) Especie *Guinardia* pretratada con organosolvente c) Especie *Amphiprora* hidrolizada con HCl.



Fuente: Autores

**Figura 20.** Filtración a) Montaje de filtración de la fase lipídica, b) Extracto lipídico.



Fuente: Autores

**Figura 21.** Volatilización del cloroformo, de los extractos lipídicos y de la biomasa residual.



Fuente: Autores

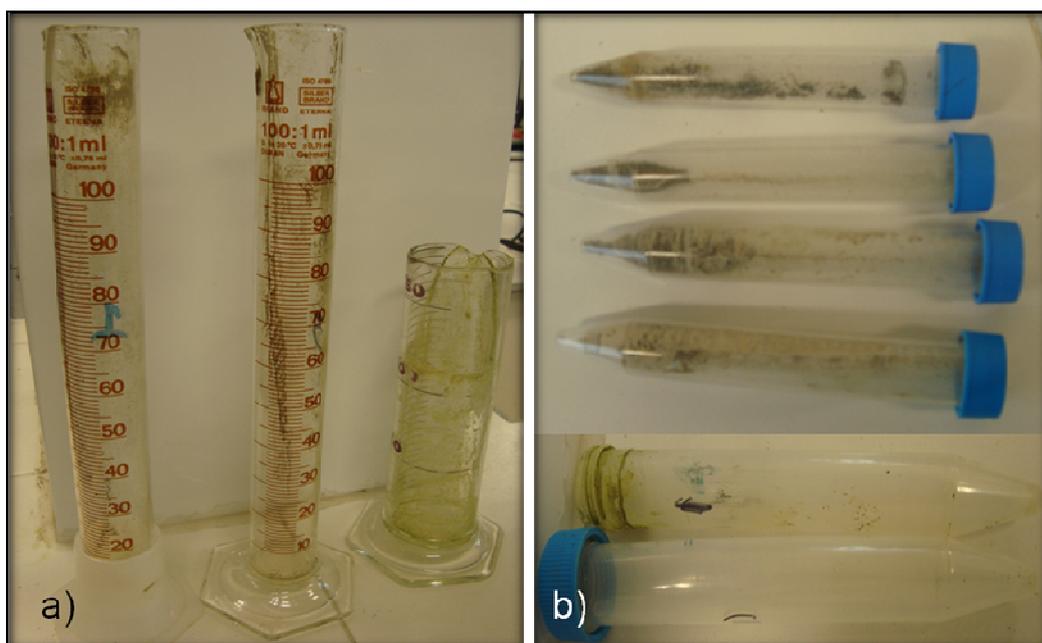
## **ANEXO F. PROTOCOLO DEL MÉTODO *BLIGH & DYER* APLICADO A LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS NATIVAS**

En un experimento típico:

1. Pesar 5 g de biomasa seca.
2. En una probeta agregar la biomasa y los solventes: 40 ml de metanol y 20 ml de cloroformo; agitar a 5000 rpm durante 10 minutos.
3. Agregar 20 ml de cloroformo y agitar durante 2 minutos.
4. Agregar 20 ml de agua y agitar durante 2 minutos.
5. Centrifugar a 3400 rpm durante 15 minutos.
6. Extraer la capa superior (metanol-agua) contenida en los tubos de centrifuga con un gotero.
7. Realizar doble filtración por gravedad a la capa inferior contenida en los tubos de centrifuga.
8. Lavar los tubos de centrifuga con 20 ml de cloroformo.
9. Dejar volatilizar el extracto y la biomasa residual en una cámara extractora hasta obtener peso constante.
10. Cuantificar el rendimiento de la extracción.

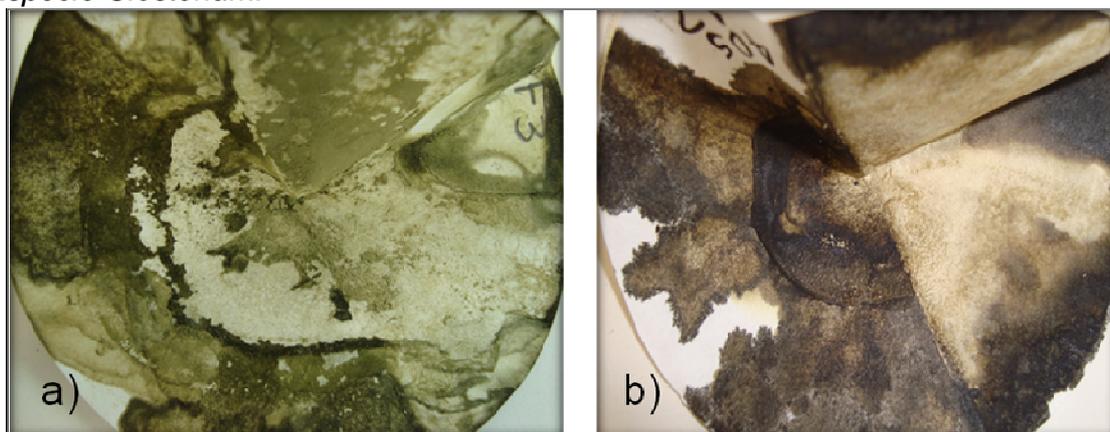
## ANEXO G. RETENCION DE BIOMASA EN LAS ETAPAS DE LA EXPERIMENTACIÓN

**Figura 22.** Biomasa retenida a) En las probetas utilizadas durante la agitación, b) Tubos de centrifuga.



Fuente: Autores

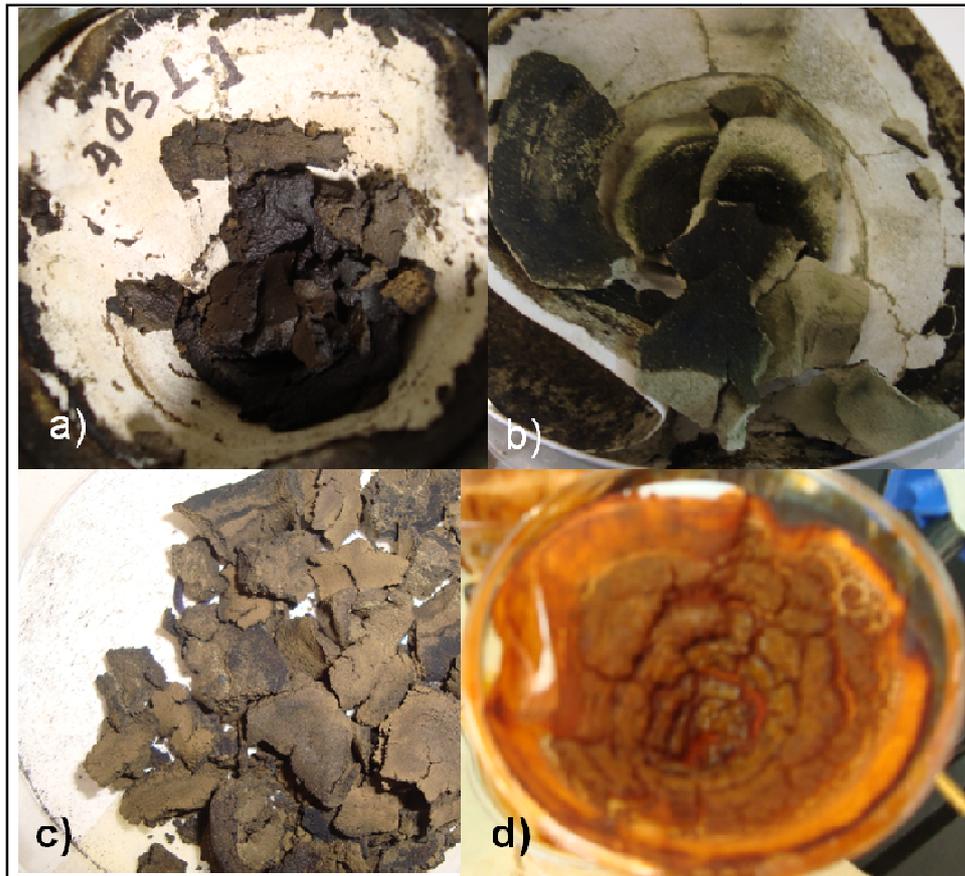
**Figura 23.** Biomasa retenida en los papeles de filtro a) Especie *Nannocloropsis*, b) Especie *Closterium*.



Fuente: Autores

## ANEXO H. BIOMASA RESIDUAL

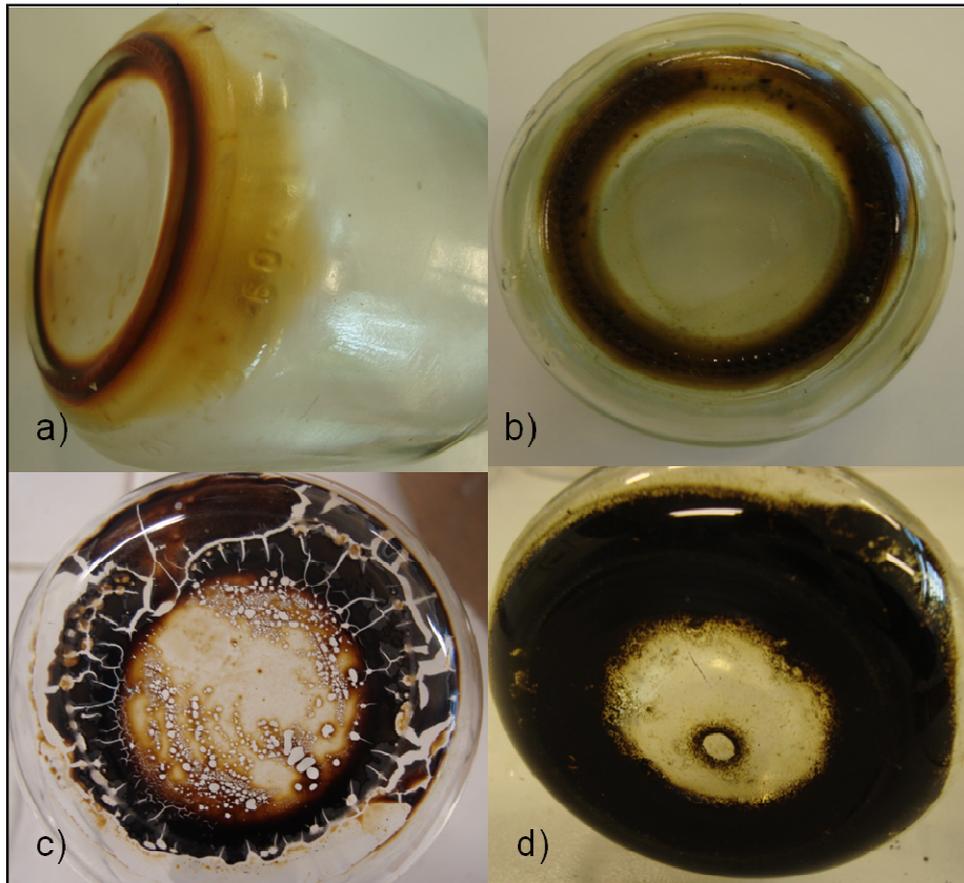
**Figura 24.** Biomasa residual de las especies a) y c) *Closterium* pretratada con organosol, b) *Amphiprora* sin disrupción celular y d) *Botryococcus braunii* sin disrupción celular.



Fuente: Autores

## ANEXO I. EXTRACTOS LIPÍDICOS

**Figura 25.** Extractos lipídicos de las especies a) *Botryococcus braunii* sin disrupción celular, b) *Nannochloropsis* sin disrupción celular c) *Guinardia* con pretratamiento organosolv, d) *Amphiprora* hidrolizada con HCl.



Fuente: Autores

## ANEXO J. CROMATOGRAMAS (ANÁLISIS FAMES)

Figura 26. Cromatograma (análisis FAMES) del extracto lipídico de *Nannocloropsis* sin disrupción celular.

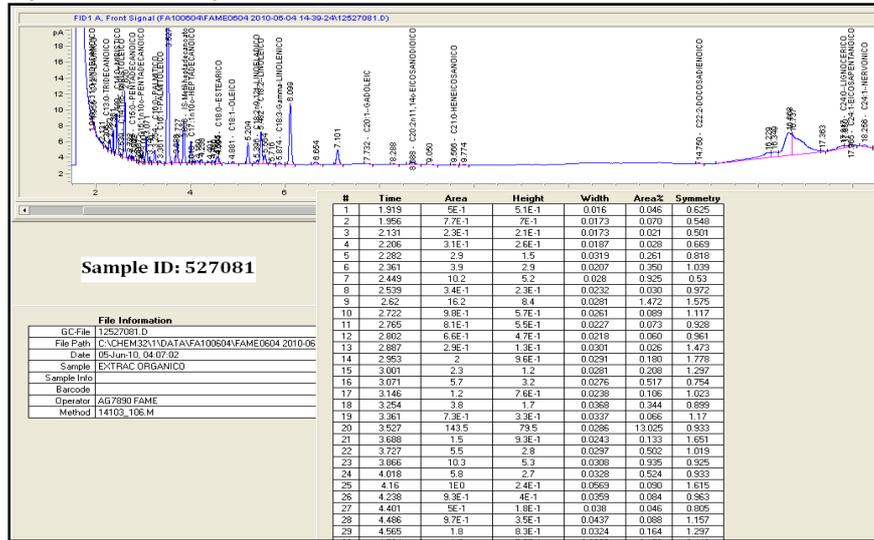
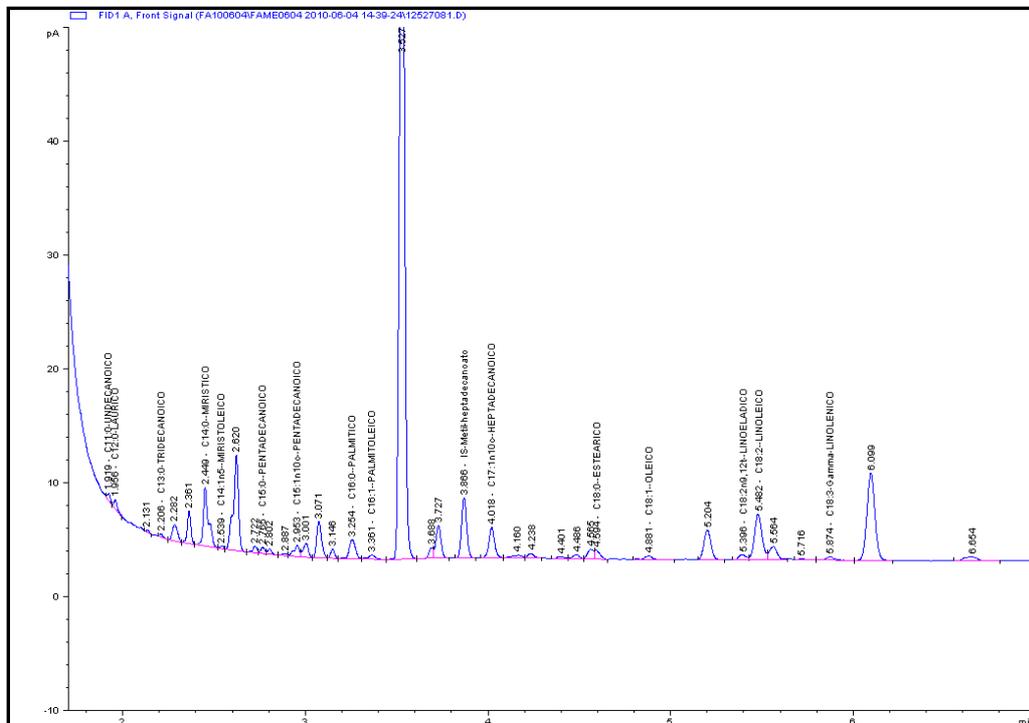
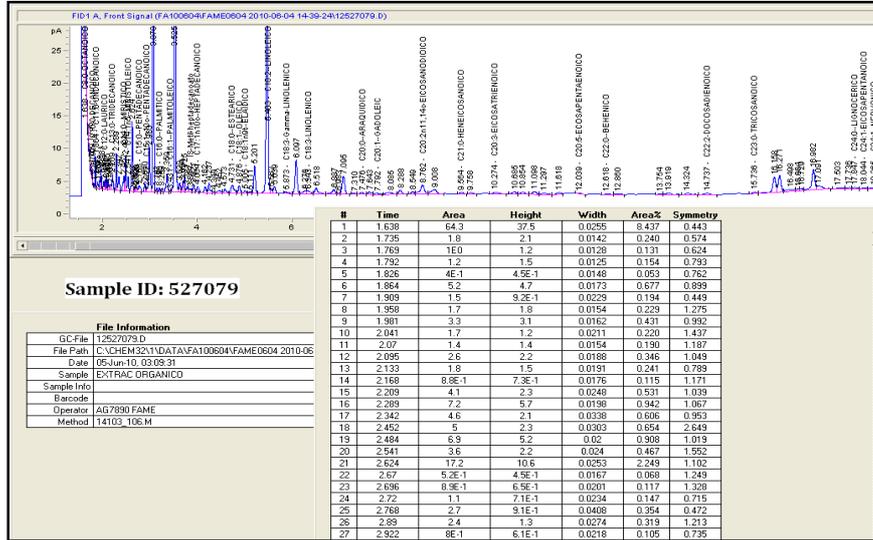


Figura 27. Cromatograma (análisis FAMES) ampliado de los primeros 7 minutos del extracto lipídico de *Nannocloropsis* sin disrupción celular.



**Figura 28.** Cromatograma (análisis FAMES) del extracto lipídico de *Botryococcus braunii* sin disrupción celular.



**Figura 29.** Cromatograma (análisis FAMES) ampliado de los primeros 7 minutos del extracto lipídico de *Botryococcus braunii* sin disrupción celular.

