

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Química

“Extracción de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris* para la producción de biodiesel”

Trabajo Final de Graduación para optar al grado de Licenciatura en Química

Nicole Velasco Jiménez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2017

## AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo y el amor de mi madre, sus constantes consejos durante toda mi carrera académica y mi vida me enseñaron a seguir adelante, mantenerme firme y nunca dar un paso atrás. Mamá te adoro.

Le quiero agradecer especialmente al Dr. Leslie Pineda y a la Dra. Marisol Ledezma por permitirme utilizar las instalaciones del CELEQ y ser una guía invaluable en mi camino.

A Cinthya Barboza del CIEMlc por su paciencia durante las sesiones de microscopía, muchas gracias por las horas dedicadas.

A RECOPE debo agradecer el interés prestado a este proyecto, sin su ayuda económica esto no hubiese sido posible.

Otra ayuda invaluable fue la del equipo de microalgas del Instituto Tecnológico de Costa Rica, a Kattia, Francinni y la profesora M. Sc Maritza Guerrero les agradezco toda la ayuda que me prestaron durante estos dos años, gracias a este proyecto nos pudimos conocer y espero que sea una amistad por mucho más tiempo.

Particularmente le agradezco a los estudiantes de ingeniería industrial Mariana Jiménez, Óscar Goluboay, Carolina Rodríguez, Arianna Cruz, Manuel Ignacio Muñoz y a la profesora M. Sc Patricia Ramírez por su ayuda en la confección del diseño experimental y el análisis estadístico de los resultados obtenidos, gracias por su paciencia y dedicación.

A la profesora M. Sc. Giselle Lutz le agradezco toda la paciencia, el conocimiento y sobre todo el apoyo que me brindó en este camino, sé que sin su ayuda no hubiese

alcanzado este logro y aprecio mucho todos los consejos que me dio durante este camino.

Al profesor M.B.A. Javier Quesada, le agradezco su paciencia al enseñarme y su buena disposición de ayudarme.

Quisiera agradecer también a M. Sc. Graciela Artavia y M. Sc. Carolina Cortés del CITA, por escucharme y tenerme paciencia, además de ayudarme en momentos de mucho estrés, siempre tuvieron la mejor disposición.

Por último, pero no menos importante le agradezco a mis amigos Dyanne, Bruno, Mónica, Erick, Guille, Vanessa y Samuel por su apoyo, su comprensión y su tolerancia durante estos dos años, sé que no fui una persona fácil y muchos días mi humor no fue el mejor, sin ustedes definitivamente no hubiera sido lo mismo, los quiero montones, son la familia que elegí.

## TRIBUNAL EXAMINADOR

Este trabajo final de graduación ha sido aceptado en su forma presente por la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química.



Ph.D. Julio Mata Segreda

Presidente del Tribunal

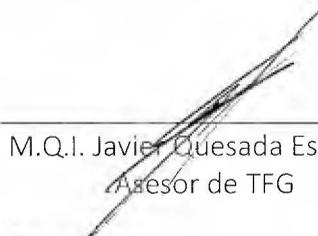


M.Sc. Maritza Guerrero Barrantes

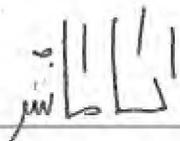
Directora de TFG



M.Sc. Giselle Lutz Cruz  
Asesora de TFG



M.Q.I. Javier Quesada Espinoza  
Asesor de TFG



Ph.D. Christopher Camacho Leandro

Miembro del Tribunal



Nicole Velasco Jiménez

Postulante

## RESUMEN

Se ha visto un cambio climático global por el aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero originado principalmente por el uso de energía fósil. Actualmente existe un faltante de sustitutos energéticos que promuevan una disminución de las emisiones y la reducción de energía fósil por unidad de producto.<sup>1</sup>

El uso de microalgas como fuente de biomasa para la producción de combustible es una fuente prometedora, en términos de excelente productividad, viabilidad y de potencial innovador para crear un valor competitivo que sea amigable con el medio ambiente. El reto de la producción a gran escala de microalgas con fines energéticos, ha sido asumido a nivel global por un gran número de empresas, y los avances en este campo se producen con rapidez.<sup>2</sup>

El presente estudio prueba diferentes métodos de extracción de aceite con disolventes con la finalidad de comparar el porcentaje de aceite extraído, para esto se aplicaron diferentes tratamientos de ruptura celular (microondas y ultrasonido) para establecer las posibles diferencias significativas con respecto a los métodos que no utilizan ruptura celular, así mismo se caracterizó el aceite extraído de las microalgas para la evaluación de su calidad como potencial biocombustible y se estudió el estado físico por microscopía electrónica de la biomasa antes y después del tratamiento de ruptura celular con el fin de aprovechar el residuo de microalga como fuente de energía, y se determinó la entalpía de combustión del residuo de microalga para identificar su potencial como fuente de energía.

En optimización de la extracción del aceite de la microalga *C. vulgaris* se utilizó un ensayo factorial definido utilizando una variación del método de Bligh & Dyer<sup>3</sup> con una mezcla de cloroformo:metanol y el método Soxhlet utilizando hexano como disolvente. Se estudió la ruptura celular causada por microondas y ultrasonido por medio de microscopía electrónica de barrido, y se comparó contra una célula sana para estudiar los cambios ocurridos en la membrana celular. El poder calórico se estudió

mediante el uso de una bomba calorimétrica y se realizó un perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases.

Se encontró que al aplicar tratamientos de ruptura celular como el ultrasonido y las microondas y variar el método de extracción de aceite, el porcentaje de aceite extraído varía significativamente, el ensayo factorial definido reveló que en un tiempo de 20 minutos de ultrasonido y utilizando el método de Bligh & Dyer se obtiene un mayor porcentaje de aceite extraído, siendo este de  $3,30 \pm 0,02$  % frente a un  $0,62 \pm 0,02$  % obtenido para el método de B&D sin tratamiento de ruptura celular. Se observa que los procedimientos de extracción de aceite que no utilizan ruptura celular tienen un menor porcentaje de aceite recuperado con respecto a los que sí aplican un tratamiento.

Se determinó la entalpía de combustión del residuo de microalgas, siendo esta de  $11,1 \pm 0,2$  MJ/kg demostrando la posibilidad de satisfacer demandas energéticas como combustible sólido, donde este residuo puede ser utilizado como materia prima para la generación de calor y potencia en la industria.

La caracterización del aceite de microalgas de la cepa *C. vulgaris* por el método de cromatografía de gases, reveló su potencial uso como biocombustible.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS .....	i
TRIBUNAL EXAMINADOR .....	iii
RESUMEN .....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
OBJETIVOS .....	1
Objetivo general .....	1
Objetivos específicos.....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
MARCO TEÓRICO .....	5
Metodologías de pretratamiento: Ruptura celular .....	5
Microondas .....	5
Ultrasonido.....	7
Métodos de extracción con disolventes .....	9
SECCIÓN EXPERIMENTAL .....	11
Características de la biomasa .....	11
Procesamiento de la muestra para microscopía electrónica de barrido: visualización de la ruptura de las células de microalgas.....	11
Determinación del porcentaje de humedad .....	12
Determinación del porcentaje de fibra cruda .....	12
Determinación de cenizas .....	13
Determinación del porcentaje de proteína cruda por el método de Kjeldhal .....	14
Determinación de la entalpía de combustión para el residuo de microalgas .....	14
Diseño del experimento .....	15
Extracción de aceite mediante el método Soxhlet.....	16

Extracción de aceite mediante la variación del método de Bligh & Dyer. ....	17
Características del aceite de microalgas .....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
Ruptura celular de la microalga <i>C. vulgaris</i> con ultrasonido y microondas.....	21
Determinación de las propiedades físico-químicas de la biomasa de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	27
Ruptura celular de la microalga causado por los tratamientos de ultrasonido y microondas. ....	31
Composición de ácidos grasos presente en el aceite extraído de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	33
CONCLUSIONES .....	38
RECOMENDACIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA .....	40
ANEXOS.....	47

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro I.</b> Niveles establecidos para la implementación del diseño factorial utilizando ultrasonido como pretratamiento. ....	16
<b>Cuadro II.</b> Niveles establecidos para la implementación del diseño factorial utilizando microondas como pretratamiento. ....	16
<b>Cuadro III.</b> Condiciones cromatográficas. ....	19
<b>Cuadro IV.</b> Análisis de varianza para el porcentaje de aceite extraído utilizando ultrasonido como tratamiento de ruptura celular vs las variables de método y tiempo (ANOVA).....	22
<b>Cuadro V.</b> Análisis de varianza para el porcentaje de aceite extraído utilizando microondas como tratamiento de ruptura celular vs las variables de método y tiempo, temperatura y presión (ANOVA). ....	24
<b>Cuadro VI.</b> Composición de la biomasa seca de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . ....	27
<b>Cuadro VII.</b> Porcentaje de aceite obtenido por el método de B&D utilizando tratamientos de ruptura celular y el método sin tratamiento celular. ....	32
<b>Cuadro VIII.</b> Perfil de ácidos grasos para la muestra de aceite de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> y el índice de cetano reportado en la literatura. ....	34
<b>Cuadro IX.</b> Composición de ácidos grasos en la microalga <i>C. vulgaris</i> bajo distintos métodos de extracción y cultivo. ....	36
<b>Cuadro X.</b> Datos obtenidos en la determinación del poder calórico de la biomasa residual de microalgas. ....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Microscopía electrónica de barrido de superficies microde microalgases (barra de escala=1µm). A) Microalga sin tratamiento previo. B) Microalga con tratamiento de microondas. C) Microalga con tratamiento ultrasónico <sup>10</sup> . ....	8
<b>Figura 2.</b> A. Fotografía la de biomasa ubicada en bandejas de secado, B. Biomasa de microalgas seca y empacada. ....	11
<b>Figura 3.</b> Diagrama de una bomba calorimétrica. ....	15
<b>Figura 4.</b> Extracción de aceite de microalgas por el método Soxhlet. A. Al inicio de la extracción B. Durante la extracción. ....	17
<b>Figura 5.</b> Proceso de eliminación de pigmentos utilizando carbón activado como adsorbente. ....	18
<b>Figura 6.</b> Efecto del método de extracción y el tiempo de exposición al ultrasonido vs el porcentaje de aceite extraído para la biomasa de la microalga <i>C. vulgaris</i> . ....	23
<b>Figura 7.</b> Efecto del método de extracción, el tiempo de exposición al ultrasonido, la temperatura y la presión empleada vs el porcentaje de aceite extraído para la biomasa de la microalga <i>C. vulgaris</i> . ....	25
<b>Figura 8.</b> Difracción de rayos X en polvo para la muestra magnética encontrada en las microalgas luego del proceso de ruptura celular por microondas. ....	29
<b>Figura 9.</b> Microscopía electrónica de barrido de superficies. A) Microalga sin tratamiento previo. B) Microalga con tratamiento de microondas. C) Microalga con tratamiento ultrasónico. ....	31
<b>Figura 10.</b> Cromatografía de gases para obtener el perfil de ácidos grasos presente en la muestra del aceite de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . ....	33
<b>Figura 11.</b> Aceite extraído de la microalga <i>C. vulgaris</i> . ....	35

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Diseño factorial propuesto para el experimento utilizando microondas como pretratamiento.....	47
<b>Anexo 2.</b> Diseño factorial propuesto para el experimento utilizando ultrasonido como pretratamiento.....	48
<b>Anexo 3.</b> Arreglo factorial para determinar cuál tratamiento de ruptura celular microondas o ultrasonido es el óptimo en el porcentaje de extracción de aceite. ....	49
<b>Anexo 4.</b> Determinación del poder calórico de la biomasa residual de microalgas por el método descrito por Daniels et al. <sup>30</sup> .....	50
<b>Anexo 5.</b> Tiempos de retención y área de los picos obtenidos mediante cromatografía de gases para los ácidos grasos presentes en la muestra de aceite de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	54

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Establecer el procedimiento físico-químico óptimo para la extracción de aceite de biomasa de la microalga *C. vulgaris* a nivel de laboratorio para la potencial producción de biodiesel y la caracterización de la biomasa residual para la generación de energía.

### Objetivos específicos

1. Probar diferentes métodos de extracción de aceite con disolventes con la finalidad de la comparación de los rendimientos.
2. Aplicar diferentes tratamientos de ruptura celular con el fin del establecimiento de las posibles diferencias significativas con respecto a los métodos que no los utilizan.
3. Caracterizar el aceite extraído de las microalgas para la evaluación de su calidad como potencial biocombustible.
4. Estudiar el estado físico por microscopía electrónica de la biomasa antes y después del tratamiento y la composición química con el fin del aprovechamiento del residuo de microalga como fuente de energía.
5. Determinar la entalpía de combustión del residuo de microalga haciendo uso de una bomba calorimétrica para la identificación de su potencial como fuente de energía.

## INTRODUCCIÓN

Se ha visto un cambio climático global por el aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero originado principalmente por el uso de energía fósil, se calcula que las emisiones de CO<sub>2</sub> son superiores a 29 gigatoneladas anuales y se estima que los procesos naturales remueven solamente 12 gigatoneladas por año. Actualmente existe un faltante de sustitutos energéticos que promuevan una disminución de las emisiones y la reducción de energía fósil por unidad de producto. Diversos países están implementando estrategias de energías alternativas estables ante la demanda mundial, que mitiguen el cambio climático, por lo que están desarrollando combustibles renovables<sup>1</sup>.

En particular, el uso de microalgas como fuente de biomasa en la producción de combustible es una fuente prometedora, en términos de excelente productividad, viabilidad y de potencial innovador para crear un valor competitivo que sea amigable con el medio ambiente. El reto de la producción a gran escala de microalgas con fines energéticos, ha sido asumido a nivel global por un gran número de empresas, y los avances en este campo se producen con rapidez. Un ejemplo es la fabricación del primer keroseno de aviación producido a partir de biomasa de microalgas realizado por la empresa Solazyme<sup>4</sup>.

Costa Rica posee un gran potencial para la producción de biomasa de microalgas, ya que cuenta con muchos sistemas acuáticos que actualmente se encuentran sin uso y grandes extensiones de terreno no aptos para actividades agropecuarias, además la temperatura y luminosidad son bastante constantes<sup>1</sup>. Las algas prometen ser la alternativa tanto ambiental como económica, ya que de ellas se pueden producir aceites (materia prima para biocombustibles),

carbohidratos, biofertilizantes, enzimas, proteínas, pigmentos, alimento para humanos y animales, o bien la biomasa puede comprimirse en forma de pellets para producción de calor y energía. Esto gracias a que las algas crecen rápidamente, entre 8 horas a tres semanas, característica que permite cosechar biomasa en periodos cortos<sup>1</sup>.

Los cultivos de microalgas de *Chlorella sp* en sistemas abiertos son prometedores debido a su rápida tasa de crecimiento y la capacidad alta de fijación de CO<sub>2</sub> y además su biomasa presenta una capacidad energética alta (18,59 MJ/kg), pueden llegar a concentraciones de carbohidratos y lípidos potenciales (19,46 %, 28,82 % respectivamente), que las convierte en cultivos viables para la producción de biodiesel<sup>5</sup> y generación de energía a partir de los residuos de microalgas.

El Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) cuenta con estanques de producción de microalgas acoplados a lixiviados procedentes de una planta de tratamiento, utilizados por las industrias para mitigar la contaminación por desechos sólidos. A su vez se ha desarrollado una producción a pequeña escala de biomasa de microalgas de 14,1 kg/m<sup>3</sup>, esta presenta un consumo mensual de CO<sub>2</sub> de 186 kg/m<sup>3</sup>, es decir 2,2 toneladas/m<sup>3</sup> por año, lo cual representa el doble del consumo de CO<sub>2</sub> de un árbol en una vida de 40 años<sup>6</sup>.

El presente trabajo consiste en el desarrollo de un sistema eficiente de extracción de aceites para su posterior transesterificación, que sea económico y ambientalmente factible. Para lograr esto, el CIB-ITCR en colaboración con RECOPE, realizan la tarea conjunta de investigar e implementar los métodos más convenientes para la extracción de aceites contenidos en la biomasa de microalgas. Se presentará la información recopilada sobre las principales

metodologías utilizadas en la obtención de lípidos de microalgas, así como sus características; con el fin de que pueda utilizarse como base para seleccionar los métodos más viables para la extracción de aceite de la microalga *Chlorella vulgaris*.

## MARCO TEÓRICO

### **Metodologías de pretratamiento: Ruptura celular**

Las microalgas 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 extraer estas sustancias desde el interior de la célula, es necesario aplicar métodos de ruptura celular, con la ventaja de que los polisacáridos contenidos en el interior se descomponen en azúcares simples facilitando la extracción de aceites<sup>7</sup>.

Aplicar un mecanismo de ruptura celular antes de la extracción puede aumentar el rendimiento de la extracción, pero dependerá de la eficiencia de la ruptura, este proceso se considera un pre-requisito para cualquier metodología de extracción a utilizar<sup>8</sup>. La ruptura celular, con el equipo y el método de extracción correcto, puede ser la clave para una extracción de lípidos eficiente<sup>9</sup>.

A continuación, se citan dos de los métodos de ruptura celular empleados a nivel internacional, enfocados en la extracción del aceite de microalgas.

### **Microondas**

La composición robusta de la pared celular es difícil de romper utilizando métodos mecánicos tradicionales, el manejo de la tecnología microondas ha sido un foco de atención para la solución de este problema<sup>10</sup>. La mayoría de los métodos de extracción de lípidos poseen algunas desventajas como largos tiempos de extracción, gran cantidad de productos químicos requeridos, o altos costos debidos al consumo de electricidad de los equipos. Estos problemas

pueden mejorarse con la aplicación de extracciones de aceites asistidas por microondas<sup>11</sup>.

La eficiencia del método asistido por microondas puede depender de diversos factores, entre ellos el tiempo, la temperatura, proporción sólido-líquido, propiedades dieléctricas de la mezcla, tipo y concentración de disolventes<sup>11</sup>.

Morfológicamente el microondas provoca una ruptura desde el interior del material debido al rápido calentamiento ocasionado por la oscilación de las sustancias polares<sup>11</sup>, lo cual origina pequeños poros en la membrana de las células, por los cuales el contenido intracelular es liberado. Algunos ensayos han mostrado que la cantidad de células rotas exitosamente después del tratamiento es cercana al 100 %<sup>12</sup>. Los aceites extraídos con pretratamiento de microondas no presentan cambios o desventajas en términos de calidad, respecto a aquellos obtenidos sin pretratamiento alguno<sup>10</sup>.

Este método no ha sido muy utilizado, pero muestra ser rápido, eficiente y de bajo costo en términos de que no se necesita el secado de la biomasa<sup>10,13</sup>. Se ha demostrado que aumenta los valores de eficiencia de la extracción en las microalgas *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en comparación con métodos como autoclavado, sonificación y molienda<sup>9</sup>.

Una desventaja del método es que puede provocar la desnaturalización de enzimas y proteínas presentes en la biomasa de microalgas debido a las altas temperaturas alcanzadas<sup>14</sup>, disminuyendo el aprovechamiento de las enzimas de microalgas, ya que pierden su actividad.

## Ultrasonido

Este método posee la ventaja de que la ruptura celular se realiza a temperaturas relativamente bajas, en comparación con el microondas, de forma que hay menos desnaturalización de proteínas debido al calor<sup>15,16</sup>.

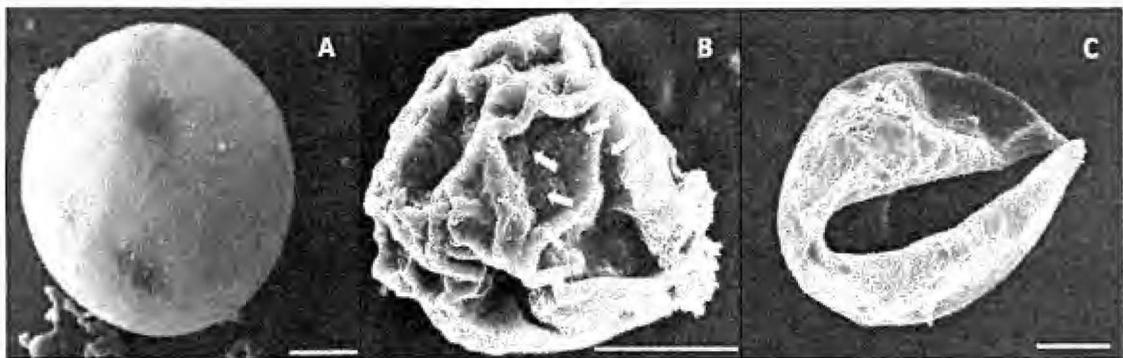
Cuando el ultrasonido es aplicado a un líquido, hay dos mecanismos por los cuales las células son afectadas. El primero de ellos es la cavitación<sup>12</sup>, es producto de microburbujas generadas debido al ultrasonido, estas se contraen y expanden con las vibraciones y eventualmente llegan a ser tan inestables que provocan una implosión violenta, enviando ondas fuertes a sus alrededores y provocando la ruptura de las células cercanas<sup>17</sup>. El segundo mecanismo de acción del ultrasonido es la corriente acústica, actúa por un efecto del mezclado de la sustancia que facilita la distribución de las ondas, la convección del líquido y favorece la disipación del calor que pueda generarse en el medio<sup>15</sup>.

El principal inconveniente de su aplicación es que no existen estudios en los cuales se optimice el proceso en la ruptura de microalgas utilizando energía ultrasónica, debe implementarse diversas condiciones según el alga que se utilizará, el objetivo de la extracción y la cantidad de la misma<sup>16</sup>.

Este método ha sido efectivo en diversos tipos de algas, por si solo se han logrado extraer hasta un 80 % del total de aceites intracelulares y además mejora la eficiencia de las extracciones con disolventes<sup>10,13,16</sup>. Ejemplo de especies en las que se ha aplicado esta tecnología con éxito son: *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis oculata* (40% de ruptura)<sup>18</sup>, *Schizochytrium limacinum*, *Chlamydomonas reinhardtii*<sup>16</sup>. La biomasa utilizada en este procedimiento puede estar en solución acuosa, pero se han obtenido mejores resultados cuando las algas son previamente secadas y re-suspendidas en un disolvente orgánico ya que

los lípidos de las células rotas tienden a quedarse con los restos celulares en lugar de ser liberados al medio acuoso<sup>19</sup>.

Otra ventaja del método es que el equipo emisor de ultrasonido no requiere gran cantidad de espacio ni requiere un costo adicional además de la energía eléctrica, Monthieu<sup>20</sup> reporta un costo de extracción de 1,72 euros por cada kilogramo de aceite extraído. Los equipos son fácilmente adquiribles en el mercado que ofrece diversas marcas, por ejemplo un equipo para escala industrial modelo UIP16000 de Heilscher con capacidad de 3 m<sup>3</sup>/h de suspensión de microalgas tiene un costo de 220 000 USD, y un consumo energético de 16 kW/h<sup>21</sup>. Bermúdez *et.al.*<sup>14</sup> reportaron un consumo de 18,4 W por cada gramo de biomasa procesada.



**Figura 1.** Microscopía electrónica de barrido de superficies de microalgas (barra de escala=1 $\mu$ m). A) Microalga sin tratamiento previo. B) Microalga con tratamiento de microondas. C) Microalga con tratamiento ultrasónico<sup>10</sup>.

## Métodos de extracción con disolventes

Los lípidos tienen diferentes tipos de interacciones, las cuales deben de romperse para extraer efectivamente los lípidos de la célula vegetal, los disolventes orgánicos no polares rompen interacciones hidrofóbicas entre lípidos neutros; disolventes orgánicos polares como por ejemplo los alcoholes, tienden a romper los puentes de hidrógeno entre los lípidos polares. Si hay presentes fuerzas iónicas fuertes dentro de la mezcla disolvente-microalga pueden romperse al hacer el medio más alcalino, por lo tanto, la escogencia del disolvente dependerá de la especie de microalga<sup>22</sup>.

El disolvente deberá ser, en la medida de lo posible, de bajo costo, no tóxico, volátil, no polar y un extractor pobre de componentes de la célula que no sean lípidos. Esto debido a que cuando la célula de la microalga es expuesta a un disolvente orgánico no polar, como hexano o cloroformo, el disolvente penetra la membrana celular hasta el citoplasma e interacciona con los lípidos neutros mediante fuerzas de tipo van der Waals para formar un complejo orgánico solvente-lípidos. Este complejo se difunde por la membrana debido a un gradiente de concentración y como resultado los lípidos neutros son extraídos de la célula<sup>2</sup>.

No todos los lípidos sirven para la producción de biodiesel, y algunas veces junto con los lípidos contenidos en la célula se pueden extraer constituyentes no lipídicos. Es por esto que el proceso de extracción debe no solo ser específico sino a su vez selectivo hacia las fracciones de lípidos deseadas tales como lípidos neutros que contengan triacilgliceroles<sup>23</sup>.

Los métodos de extracción con Soxhlet y el de Bligh & Dyer son los comúnmente usados en la extracción de lípidos a partir de biomasa de microalgas.

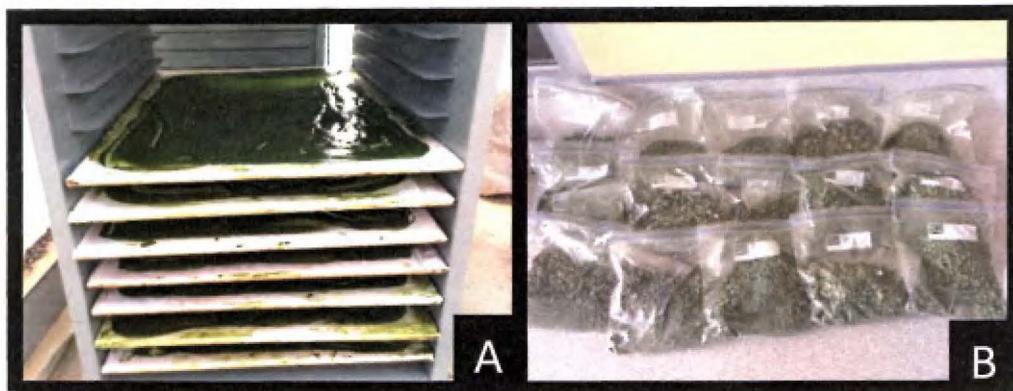
El método de Soxhlet utiliza hexano, se pueden usar otros disolventes como éter etílico, pero el hexano presenta buenos resultados además de tener un bajo costo<sup>24,25,26</sup>. Se ha comprobado que el hexano es menos tóxico que otros disolventes, como el cloroformo y tiene una baja afinidad por los contaminantes no lipídicos y una alta selectividad por fracciones de lípidos neutros.

El método de Bligh y Dyer (B&D) utiliza una mezcla de cloroformo-metanol, y presenta la eficiencia más alta, aproximadamente un 95 % del total de lípidos<sup>3</sup>. Este método presenta buenos resultados, en la literatura se encuentran rendimientos del 23,78 % para *N. oculata*<sup>27</sup>, 13,72 % para *Chaetoceros calcitrans*<sup>28</sup> y 10,6 % para *C. vulgaris*<sup>24</sup>. La desventaja de este método es el uso de cloroformo ya que es sumamente dañino para el ambiente y además, para altos contenidos de lípidos (mayor al 2 %) el método requiere de algunas variaciones, como un cambio en la composición de la mezcla del disolvente o el tiempo de extracción. Por ejemplo en el método Zhu<sup>28</sup>; si no se hacen variaciones el contenido de lípidos obtenido siempre es significativamente menor<sup>29</sup>.

## SECCIÓN EXPERIMENTAL

### Características de la biomasa

La biomasa de microalgas seca fue provista por el CIB, en donde el secado se da gracias a un pequeño prototipo de secador tipo solar, el cual consta de una cama de 5 metros de largo x 1 metro de ancho, con un techo tipo "V" invertida, abierto a los extremos, la temperatura puede alcanzar entre 30° C y 80° C. Tiene incorporado paneles solares para un control del vapor de agua generado en la cama. La biomasa se coloca a mano con boquillas y una bolsa tipo embudo, con el fin de distribuir de forma homogénea la biomasa en la cama (figura 2).



**Figura 2.** A. Fotografía la de biomasa ubicada en bandejas de secado, B. Biomasa de microalgas seca y empacada.

### Procesamiento de la muestra para microscopía electrónica de barrido: visualización de la ruptura de las células de microalgas

Luego de pretratar las microalgas con ondas ultrasónicas o microondas, las células de microalgas se trataron con glutaraldehído al 2,5 % (v/v) a 4 °C por 16 h para fijar las células. Las células se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O por 10 minutos cada vez, luego con tetraóxido de osmio al 1 % por 1 hora, seguidamente con un buffer de fosfatos a un pH de 7,4 y se deshidrataron utilizando etanol en concentraciones

de 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90% respectivamente por un período de 10 min cada uno y luego tres veces con una concentración al 100 % por 10 min cada vez. Se utilizó secado por sublimación 4 veces con terbutanol por un periodo de 20 min, para asegurar el secado de las muestras. Estas fueron montadas en talones y cubiertas con oro utilizando un cobertor iónico. La morfología de las superficies de las células rotas se observó por SEM utilizando un voltaje de 15,0 kV.

#### Determinación del porcentaje de humedad

Se colocaron tres cápsulas de porcelana en una estufa de convección a 130 °C por 30 minutos, se dejaron enfriar y se pesaron en balanza analítica, hasta llegar a masa constante. Seguidamente se agregaron aproximadamente 5 g de la muestra con una exactitud de 0,1 mg a cada una de las cápsulas y se colocaron a 130 °C por una hora; terminada la hora se dejaron enfriar y se pesaron en balanza analítica, el procedimiento se repitió hasta llegar a masa constante. A cada una de las muestras se les calculó el porcentaje de humedad (ecuación 1).

$$\%humedad = \frac{\text{masa muestra seca (g)}}{\text{masa muestra inicial (g)}} \times 100 \quad \text{[Ecuación 1]}$$

#### Determinación del porcentaje de fibra cruda

A la muestra desecada al aire y después en la estufa, se le extrajo por triplicado el aceite con éter de petróleo, se tomó aproximadamente 2 g del producto extraído con una exactitud de 0,1 mg y se transfirió a un beaker de 600 mL, se le añadió 200,0 mL de una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,128 mol/L en ebullición. Se colocó en un frasco de Berzelius sobre el digestor y se dejó hervir durante 30 minutos. Se rotó el Berzelius constantemente para evitar que los sólidos se adhirieran a la pared, se retiró el Berzelius y se filtró la mezcla digerida a través de un embudo Büchner recubierto con un filtro Whatman número 40 de 125 mm de diámetro, se lavó el Berzelius con 75,0 mL de agua hirviendo y se pasó a través del

embudo, se lavó 2 veces más con 50,0 mL de agua y se retiró con cuidado el residuo sólido y el filtro se colocó de nuevo en el Berzelius, se agregaron 200,0 mL de NaOH 0,313 mol/L en ebullición al Berzelius y se dejó hervir por 30 minutos, se retiró el Berzelius y se filtró de la misma manera descrita anteriormente. Se lavó la muestra filtrada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,128 mol/L en ebullición, 3 veces con porciones de 50,0 mL de agua y una vez con 25,0 mL de etanol, se transfirió el residuo a una cápsula de incineración previamente calcinada, se desecó por 2 horas a 130 °C, se enfrió en un desecador y se midió la masa (masa 1). Posteriormente se calcinó por 30 minutos a 600 °C y se dejó enfriar en un desecador para luego medir su masa de nuevo (masa 2). El procedimiento se realizó por triplicado y se calculó el porcentaje de fibra en las muestras de microalga (ecuación 2).

$$\%Fibra = \left( \frac{Masa\ 1 - Masa\ 2}{Muestra} \right) \times 100 \quad [Ecuación\ 2]$$

#### Determinación de cenizas de la biomasa de microalgas

Se midieron aproximadamente 10 g de muestra de biomasa de microalgas con una exactitud de 0,1 mg por triplicado en un crisol de porcelana de cerca de 6 cm de diámetro que fue calcinado, enfriado en desecador y cuya masa se determinó rápidamente, al haber alcanzado temperatura ambiente. Se calcinó la muestra de microalgas en una mufla a 550 °C hasta masa constante, se enfrió en un desecador y al alcanzar temperatura ambiente se midió su masa, y finalmente se calculó el porcentaje de cenizas de la muestra (ecuación 3).

$$\%Cenizas = \frac{masa\ cenizas(g)}{masa\ muestra\ inicial\ (g)} \times 100 \quad [Ecuación\ 3]$$

### Determinación del porcentaje de proteína cruda en la biomasa de microalgas por el método de Kjeldhal

Se pesaron por triplicado tres muestras de microalgas de aproximadamente 2 g con una exactitud de 0,1 mg en la cuarta parte de un papel de filtro que no genera cenizas y se colocó cuidadosamente dentro de los balones de Kjeldhal, se agregó 10,00 mL de mezcla digestiva ( $H_2SO_4$ -  $K_2SO_4$ ) y una gota de los catalizadores de Cu y Se, seguidamente se colocó el balón inclinado y se calentó hasta que dejó de formar espuma. Se reflujo la mezcla digestiva hasta que la disolución se aclaró, en este punto se dejó 30 minutos más en reflujo, se enfrió y se transfirió cuantitativamente a un minidestilador, se lavó con 3 porciones de 5 mL de agua destilada y se neutralizó al viraje de la fenolftaleína con NaOH (1+1). Se destiló 75 mL de la mezcla digerida por arrastre con vapor y se recolectó el destilado introduciendo el gotero del minidestilador en 10 mL de disolución de ácido metabórico e indicadores, se levantó y se retiró el gotero del líquido recolectado y se lavó destilando 10 mL adicionales, finalmente se valoró con una disolución de  $H_2SO_4$  0,0500 mol/L y se calculó el porcentaje de proteína de la muestra de microalgas (ecuación 4 y 5).

$$\%Nitrógeno = \left( \frac{mL \text{ de } H_2SO_4 \times 0,100 \text{ N}}{\text{masa muestra inicial (g)}} \times 0,014 \right) \times 100 \quad [\text{Ecuación 3}]$$

$$\%Proteína \text{ cruda} = \%Nitrógeno \times 6,25 \quad [\text{Ecuación 4}]$$

### Determinación de la entalpía de combustión en el residuo de microalgas

Se siguió el experimento descrito por Daniels, *et.al.*<sup>30</sup>. Durante la realización del experimento se trabajó a una temperatura ambiente promedio de 25 °C y una presión atmosférica promedio de 88 kPa. Se utilizó una bomba calorimétrica de oxígeno, un alambre de Fe con un calor de combustión de fábrica de 1400 cal/g (Parr Instrument). Se agregaron 2000 mL de agua destilada a la cámara de la bomba calorimétrica utilizando un balón aforado de (2000,00 ± 0,50) mL calibrado

a un temperatura de 20 °C, seguido de esto se llenó la cámara con oxígeno provisto por la compañía Infra S.A. En la determinación del calor específico del calorímetro se utilizó ácido benzoico con un calor de combustión estandarizado de -26,43 kJ/mol. El volumen de la bomba es de 330 mL medido en una probeta de 500 mL (figura 3).

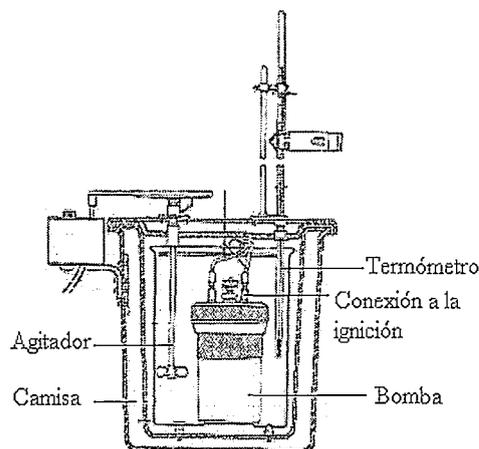


Figura 3. Diagrama de una bomba calorimétrica.

#### Diseño del experimento para la extracción de aceite de microalgas

Se trabajaron dos diseños factoriales, uno de  $2^2$  y otro de  $2^4$ , en el primer diseño, el cual involucra un pretratamiento con ultrasonido con una potencia de 40 W y una frecuencia de 20 kHz se estudiaron dos factores: método de extracción y tiempo; en el segundo, con un pretratamiento de microondas se utilizó una potencia de 550 W y una frecuencia de 2,450 MHz se estudiaron cuatro factores: método de extracción, temperatura, tiempo y presión (cuadro I, cuadro II, anexo 1 y 2). Esto se analizó por medio de un ANOVA, Minitab (versión 17.3.1, 2016).

Cuadro I. Niveles establecidos para la implementación del diseño factorial utilizando ultrasonido como pretratamiento.

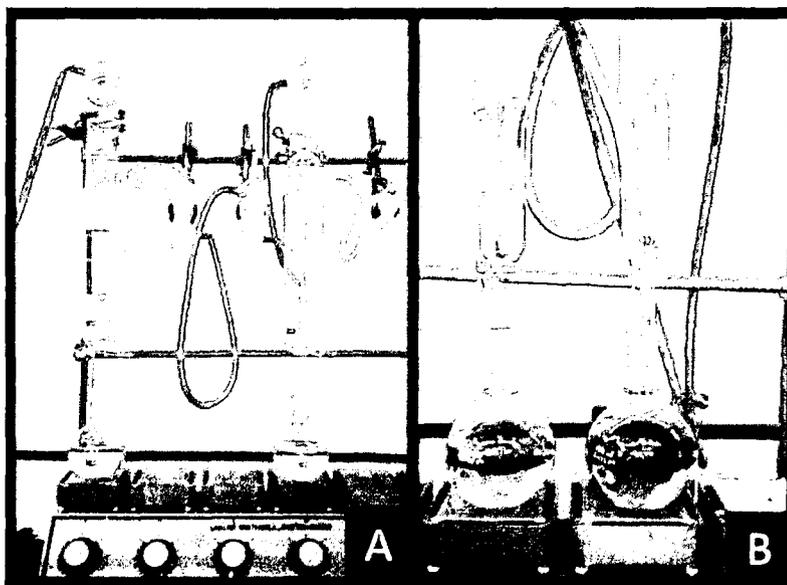
Factores	1	2
Método	Variación Bligh & Dyer	Soxhlet
Tiempo	10 min	15 min

Cuadro II. Niveles establecidos para la implementación del diseño factorial utilizando microondas como pretratamiento.

Factores	1	2
Método	Variación Bligh & Dyer	Soxhlet
Temperatura	80° C	90° C
Tiempo	30 s	45 s
Presión	1 atm	1,5 atm

#### Extracción de aceite de microalgas mediante el método Soxhlet.

Se utilizó ~5 g de biomasa previamente secada y se extrajo el aceite en un balón de 500 mL con 250 mL hexano por triplicado, esta mezcla se dejó en reflujo en el Soxhlet por aproximadamente 8 horas a ~70 ° C (punto de ebullición del hexano). Posteriormente, la biomasa residual se removi6 del Soxhlet y se separ6 el hexano del aceite por medio de un rotavapor (figura 4).



**Figura 4.** Extracción de aceite de microalgas por el método Soxhlet. *A.* Al inicio de la extracción *B.* Durante la extracción.

#### **Extracción de aceite de microalgas mediante la variación del método de Bligh & Dyer.**

Se implementó una variación del método de extracción recomendado por Salazar<sup>28</sup>.

Se pesaron por triplicado 10 g de muestra con una exactitud de 0,1 mg, se añadió 75 mL de una mezcla de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  2:1 (v/v) y se agitó en un beaker de 250 mL, se dejó reposar la mezcla, al menos, 24 horas a 4 °C y protegido de la luz, de esa manera se favoreció la extracción de los lípidos, al evitar la oxidación de estos. La muestra de microalgas se filtró para separar la biomasa de la disolución, se le hicieron 3 lavados de 5 mL con la mezcla cloroformo:metanol. Una vez filtrada la mezcla disolventes-microalgas, se agregó 2,0 g de carbón activado al filtrado para eliminar los pigmentos presentes en la disolución, se dejó 24 horas en el refrigerador hasta que la muestra presentara un color amarillo pálido,

característico de los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos, si los pigmentos no desaparecían se debía agregar más carbón activado hasta un máximo de 1,0 g adicional, se agitó en vortex y se guardó en refrigeración por 24 horas más (figura 5).



**Figura 5.** Proceso de eliminación de pigmentos utilizando carbón activado como adsorbente.

### **Características del aceite extraído de microalgas**

Al aceite extraído se le determinó los ésteres de los ácidos grasos por cromatografía de gases en el Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos (CITA) de acuerdo con el método “Ácidos grasos saturados, insaturados, trans y omegas por CG”<sup>31</sup>, el cual consiste en la extracción y transesterificación del aceite vegetal o grasa de la muestra utilizando éter de petróleo y trifluoruro de boro en metanol respectivamente. El extracto resultante rico en ésteres metílicos de ácidos grasos se inyecta en el cromatógrafo de gases para su identificación y cuantificación.

La identificación se realiza inyectando una matriz compuesta por 37 ésteres metílicos de ácidos grasos para verificar el tiempo de retención de cada analito y la cuantificación se efectúa mediante la normalización de áreas. Los análisis de la cromatografía de gases llevan condiciones específicas y relevantes para la

obtención del perfil de ácidos grasos de la muestra del aceite extraído de la biomasa de microalgas (cuadro III).

Cuadro III. Condiciones cromatográficas.

Parámetro	Condición
Autoinyector AOC-20i	
Volumen de inyección	2,0 µL
Lavados con muestra	2 veces
Lavado con disolvente	2 veces
Columna	
SP <sup>TM</sup> -2560 Supelco	100 m x 0,25 m x 0,2 µm
Fase estacionaria	poli(biscianopropilsiloxano)
Temperatura 1	100 °C
Tiempo de equilibrio	3 °C/min 100-200 °C, 5 min 0,50 °C/min 200-205 °C, 8 min
Rampa	0,75 °C/min 205-210 °C, 2,5 min 1,5 °C/min 210-235 °C, 6 min
Detector de FID	
Temperatura	250 °C
Velocidad de muestreo	8 ms
SPL1	
Temperatura	225 °C
Modo	Split
Split	200,0

Presión	195,2 kPa
Flujo total	53,8 mL/minuto
Flujo de la columna	0,75 mL/minuto
Velocidad lineal	15,2 cm/s
Flujo de purga	3,0 mL/minuto
Make up	75 kPa
Hidrógeno	65 kPa
Aire	60 kPa

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este estudio reveló que el procedimiento físico-químico óptimo para extraer aceite a partir de la biomasa de microalgas fue en un tiempo de 20 minutos de ultrasonido y utilizando el método de Bligh & Dyer, con este método se obtuvo un porcentaje de aceite extraído de  $3,30 \pm 0,02$  % frente a un  $0,62 \pm 0,02$  % obtenido para el método de B&D sin tratamiento de ruptura celular. Se observa que los procedimientos de extracción de aceite que no utilizan ruptura celular tienen un menor porcentaje de aceite recuperado con respecto a los que sí aplican un tratamiento (cuadro VII).

Se determinó la entalpía de combustión del residuo de microalgas, siendo esta de  $11,1 \pm 0,2$  MJ/kg demostrando la posibilidad de satisfacer demandas energéticas como combustible sólido, donde este residuo puede ser utilizado como materia prima para la generación de calor y potencia en la industria.

La caracterización del aceite de microalgas de la cepa *C. vulgaris* por el método de cromatografía de gases, reveló su potencial uso como biocombustible.

### Ruptura celular de la microalga *C. vulgaris* con ultrasonido y microondas

Los resultados del ANOVA revela que al aplicar ultrasonido como tratamiento de ruptura celular de microalgas y variar el método de extracción de aceite, el porcentaje de aceite extraído obtenido es significativamente diferente frente a métodos que no utilizan ruptura celular. El mayor porcentaje de aceite extraído se obtuvo en un tiempo de exposición de 20 minutos de ultrasonido y utilizando el método de Bligh & Dyer, siendo este de  $3,30 \pm 0,02$  % frente a un  $0,62 \pm 0,02$  % obtenido para el método de B&D sin tratamiento de ruptura celular. Los resultados del ANOVA revelan que hay diferencias significativas en el método

empleado para la extracción de aceites y el tiempo de exposición al ultrasonido en la biomasa de microalgas (cuadro IV, anexo 2).

Cuadro IV. Análisis de varianza para el porcentaje de aceite extraído utilizando ultrasonido como tratamiento de ruptura celular vs las variables de método y tiempo (ANOVA).

Fuente	Grados de libertad	Valor-F	Valor-P
<i>Método</i>	1/11	23123,75	0,000
<i>Tiempo</i>	1/11	5912,73	0,000
<i>Método*Tiempo</i>	1/11	780,76	0,000

Nota: R<sup>2</sup>=0,9997

El resultado del análisis de los efectos principales demuestra que el método utilizado en la extracción de aceite de microalgas tiene una mayor repercusión sobre el porcentaje de aceite extraído que el tiempo de exposición al ultrasonido (figura 6).

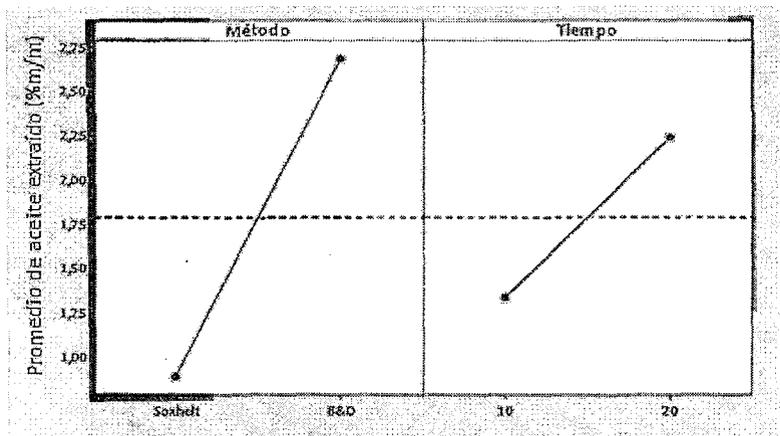


Figura 6. Efecto del método de extracción y el tiempo de exposición al ultrasonido vs el porcentaje de aceite extraído para la biomasa de la microalga *C. vulgaris*.

Los resultados del ANOVA revela que al aplicar microondas como tratamiento de ruptura celular de microalgas y variar el método de extracción de aceite, el porcentaje de aceite obtenido es significativamente diferente frente a métodos que no utilizan ruptura celular. El mayor porcentaje de aceite extraído se obtuvo en un tiempo de 20 segundos a 80 °C de temperatura, 1 atm de presión y el método de extracción B&D, siendo este de  $3,5 \pm 0,4$  % frente a un  $0,62 \pm 0,02$  % obtenido para el método de B&D sin tratamiento de ruptura celular. Los resultados del ANOVA revelan que existen diferencias significativas en el método empleado para la extracción de aceites, el tiempo de exposición a las microondas y la presión utilizada en la biomasa de microalgas (cuadro V, anexo 1).

Cuadro V. Análisis de varianza para el porcentaje de aceite extraído utilizando microondas como tratamiento de ruptura celular vs las variables de método y tiempo, temperatura y presión (ANOVA).

Fuente	Grados de libertad	de Valor-F	Valor-P
<i>Método</i>	1/47	232,20	0,000
<i>Tiempo</i>	1/47	2,90	0,097
<i>Temperatura</i>	1/47	0,05	0,829
<i>Presión</i>	1/47	10,68	0,002
<i>Tiempo*Temperatura</i>	1/47	6,82	0,013
<i>Tiempo*Presión</i>	1/47	0,36	0,550
<i>Temperatura*Presión</i>	1/47	0,54	0,466
<i>Tiempo*Temperatura*Presión</i>	1/47	4,27	0,046

Nota: R<sup>2</sup>=0,8686

El resultado del análisis de la gráfica de los efectos principales demuestra que el método empleado para la extracción de aceite de microalgas tiene una mayor influencia sobre el porcentaje de aceite extraído que el tiempo de exposición al microondas, la temperatura y presión aplicada (figura 7).

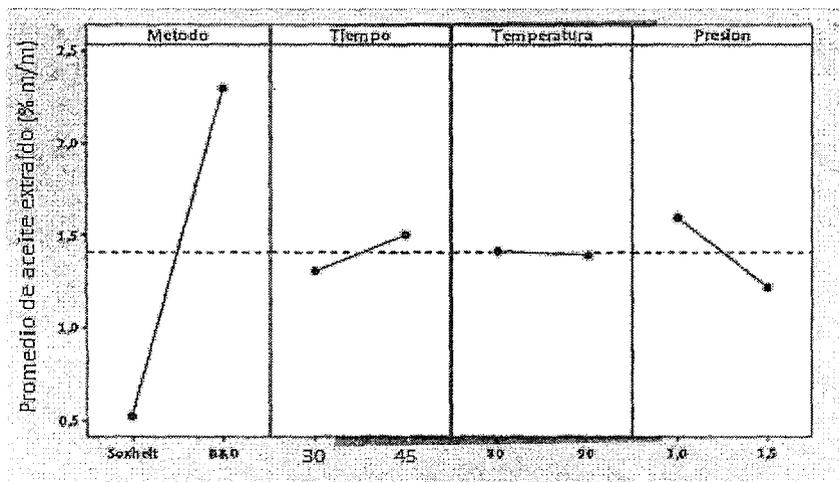


Figura 7. Efecto del método de extracción, el tiempo de exposición al ultrasonido, la temperatura y la presión empleada vs el porcentaje de aceite extraído para la biomasa de la microalga *C. vulgaris*.

La extracción de lípidos de la microalga *C. vulgaris* asistida por ultrasonido ha sido reportada en varios estudios, dentro de los métodos probados se utiliza la mezcla cloroformo:metanol (2:1) como disolvente obteniendo un 19 % de lípidos totales a una frecuencia de 40 KHz y una potencia de 132 W<sup>29</sup>. Ma *et.al*<sup>10</sup> reportan un 11,6 % de lípidos extraídos de la microalga *C. vulgaris* tratada con ultrasonido a una frecuencia de 40 KHz y una potencia de 200 W por un periodo de 20 minutos y obtuvieron el mismo porcentaje utilizando microondas a 2,450 MHz y 530 W por un periodo de 75 segundos, en ambos experimentos no se reporta la temperatura de operación. La ruptura celular de la microalga *Chlorella vulgaris* por medio de microondas ha sido reportada en estudios previos utilizando una potencia de 2,450 MHz a una temperatura de 100 °C por un periodo de 5 min, bajo estas condiciones se reportó una concentración de lípidos de 4,8 %.<sup>32</sup> Otros estudios utilizan una potencia de 400 W a una temperatura de 100 °C por un periodo de 70 segundos obteniendo una concentración de lípidos de 33,7 %.<sup>33</sup>

El porcentaje de aceite extraído que se obtuvo en este estudio revela que no es equiparable a los reportados en otras investigaciones realizadas bajo condiciones similares, esto se debe probablemente a que la cosecha de microalgas se ejecutó antes de llegar a su valor máximo de producción de aceites intracelular, por lo tanto, se deduce que los métodos químicos de extracción de aceites en este estudio son eficientes, no así el tiempo de cosecha, donde este debe ejecutarse en el estado estacionario de la curva exponencial de crecimiento celular.

Los resultados generados en este estudio revelan que no hay diferencia significativa en el tratamiento de ruptura celular empleado (ultrasonido o microondas), tal como lo indica Ma *et.al*<sup>10</sup>, no así para el método empleado en la extracción de aceite, siendo el más exitoso el de B&D.

Las investigaciones consultadas no presentan una optimización clara de las variables que afectan el porcentaje de aceite extraído (tiempo, temperatura y presión) al utilizar un tratamiento de ruptura celular, no así para este estudio donde se optimizó la extracción de aceite para ambos tratamientos de ruptura celular (microondas y ultrasonido) y el método de extracción (Bligh & Dyer y Soxhlet), produciendo resultados con una validación mayor.

Determinación de las propiedades físico-químicas de la biomasa de la microalga  
*Chlorella vulgaris*

Se determinó el poder calórico del residuo de microalga haciendo uso de una bomba calorimétrica para la identificación de su potencial como fuente de energía. El resultado fue prometedor al ser este comparado con otros residuos orgánicos de la agroindustria, así mismo los resultados de las otras variables evaluadas demuestran un potencial de uso en la industria agroalimentaria (cuadro VI, anexo 4).

Cuadro VI. Composición de la biomasa seca de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Propiedad	Valor
Humedad (%)	6,799 ± 0,001
Cenizas (%)	41,51 ± 0,02
Fibra cruda (%)	9,21 ± 0,02
Proteína (%)	21,1 ± 0,4
Poder calórico (MJ/kg)	11,1 ± 0,2

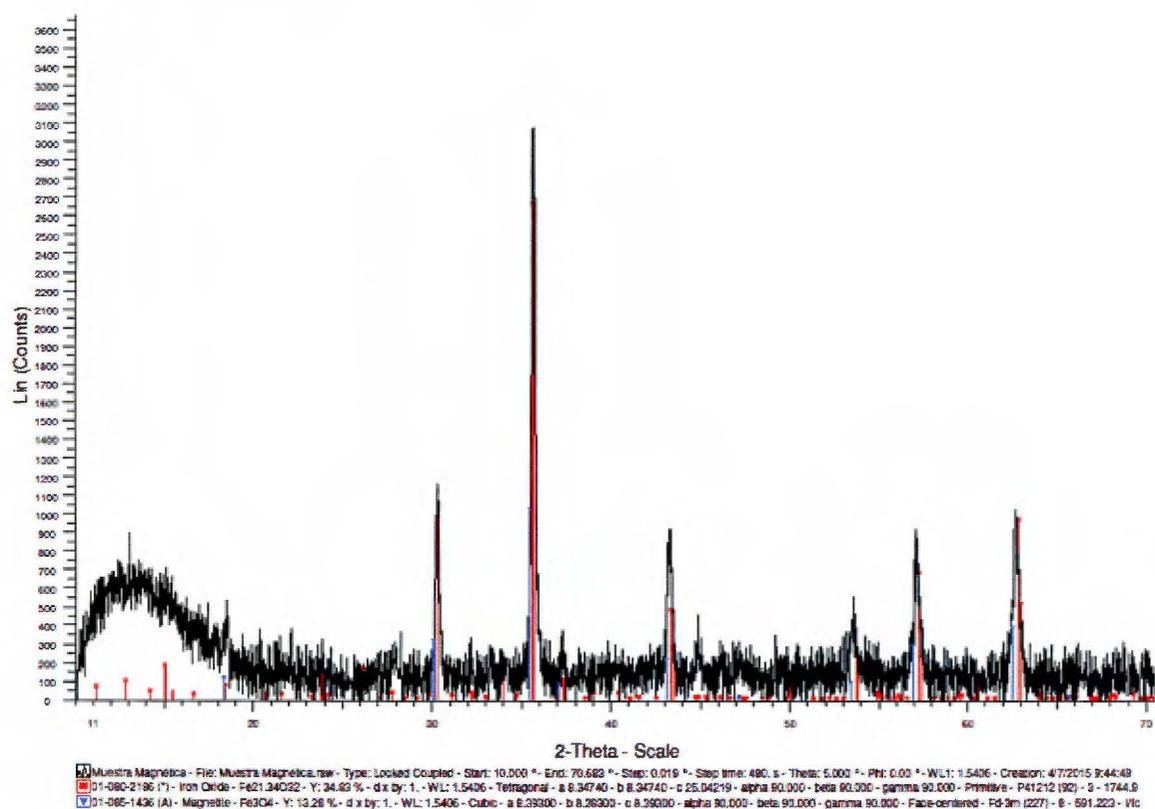
El contenido energético de diversas biomásas residuales de origen agrícola han sido reportados en varios estudios, dentro de los cuales se encuentra la cascarilla de arroz con un poder calórico de 15,1 MJ/kg<sup>34</sup>, el bagazo de caña con 7,74 MJ/kg<sup>35</sup>, el bagazo de caña de Cenicaña Colombia con un 18,1 MJ/kg<sup>36</sup> y el pinzote de palma africana con un 19 MJ/kg<sup>37</sup>.

El poder calórico de la biomasa de microalgas se encuentra cercano a los valores reportados para el bagazo de caña y otros residuos agrícolas, los cuales han demostrado un resultado prometedor como combustible sólido, por lo cual no hay duda que la biomasa de la microalga *C. vulgaris* representa un valioso potencial energético, con la ventaja de ser un material renovable, de manera tal, que el residuo de microalgas luego de la extracción de su aceite pueda servir como combustible para la generación de calor y potencia en la industria, con la producción mínima de desechos.

Al estudiar el proceso de combustión de un residuo orgánico como lo es la biomasa de microalgas es importante analizar el porcentaje de cenizas, ya que es un desecho luego de la combustión y debe minimizarse. El porcentaje de cenizas reportado para la cascarilla de arroz se encuentra levemente debajo del 20 %<sup>34</sup>, si se compara con el porcentaje obtenido para la biomasa de microalgas se puede observar que se duplica este valor, lo cual podría ser un inconveniente en el proceso de combustión debido a la cantidad de desecho que se obtendría, sin embargo este porcentaje puede variar si se cultivan las algas en un ambiente con menos minerales. Las microalgas con las que se trabajó en esta investigación fueron cultivadas en aguas residuales de un matadero animal, la mezcla de cultivo estaba compuesta por un (30-40) % de mezcla animal (80 % sangre y 20 % heces de vaca y cerdo), el restante porcentaje se compuso de agua no potable, por lo que es de esperar que si las microalgas crecen en un ambiente más controlado el porcentaje de cenizas puede disminuir al haber una menor cantidad de minerales y por tanto los desechos generados de la combustión de la biomasa.

En los procesos de extracción de aceite utilizando microondas como método de ruptura celular se encontró un residuo magnético el cual se analizó por la técnica de difracción de rayos X en polvo, al comparar el residuo magnético con

la base de datos disponible, se encontró que la muestra analizada es una mezcla de óxido de hierro (II) y óxido de hierro (III) que coincide con la estructura de la magnetita (figura 8). Debido a que la magnetita se encontraba únicamente después de realizada la ruptura celular, se puede pensar que esta se encontraba dentro de la estructura de la microalga y no era un residuo adsorbido en la superficie de la misma, por ende, la microalga *Chrorella vulgaris* podría ser utilizada como material de biorremediación tal como se ha comprobado en otros estudios para la fijación de carbono<sup>38</sup> y la remoción de metales pesados como el mercurio<sup>39</sup> y el arsénico<sup>40</sup>.



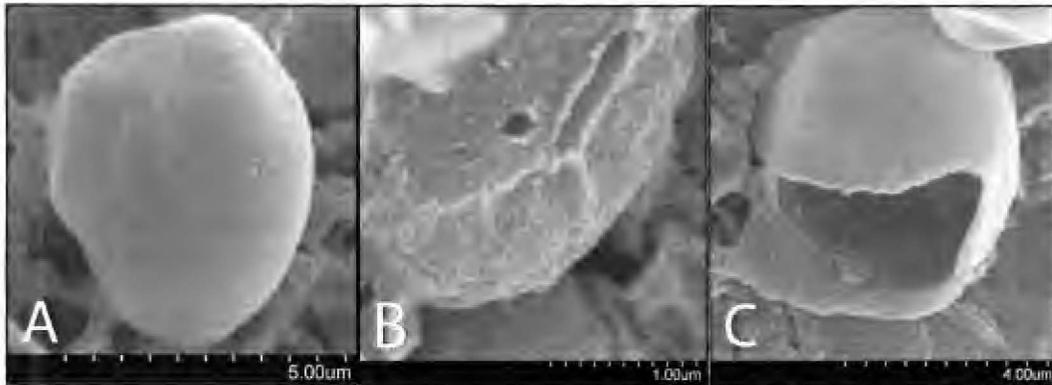
**Figura 8.** Difracción de rayos X en polvo para la muestra magnética encontrada en las microalgas luego del proceso de ruptura celular por microondas.

Es importante rescatar el uso de las microalgas como un método eficaz en el tratamiento de aguas residuales, la cepa *Chlorella vulgaris* tiene la ventaja de poder crecer en condiciones heterotróficas<sup>41</sup>, es decir, sin la necesidad de estar expuestas a la luz, por lo que pueden crecer en un ambiente controlado como un estanque, a diferencia de otro tipo de algas verdes que requieren la luz solar por lo que es necesario el uso de tanques extensos y poco profundos que hacen que el proceso sea poco factible económicamente y difícil de controlar.

Otra propiedad a analizar es el contenido de fibra y proteína que se encuentran en 9,21 % y 21,1 % respectivamente, lo cual constituye un valor nutricional alto que podría utilizarse en la industria alimentaria como alimento para ganado<sup>42</sup>, o incluso como alimento funcional para seres humanos que según estudios puede promover la salud cardiovascular al poseer altos contenidos de antioxidantes y propiedades antihipertensivas<sup>43</sup>.

### Ruptura celular de la microalga causado por los tratamientos de ultrasonido y microondas.

Se realizó un estudio por medio de microscopía electrónica de barrido para evaluar el estado de la microalga antes y después de aplicar los tratamientos de microondas y ultrasonido, ya que se consideró la posibilidad de un aumento en la extracción de aceite si se rompía de alguna manera la pared celular de la microalga (figura 9). El resultado demuestra que sin lugar a dudas la pared celular de la microalga se rompe al aplicar estos tratamientos.



**Figura 9.** Microscopía electrónica de barrido de superficies. A) Microalga sin tratamiento previo. B) Microalga con tratamiento de microondas. C) Microalga con tratamiento ultrasónico.

Si se compara el porcentaje de aceite obtenido utilizando métodos que involucren tratamientos de ruptura celular contra uno que no lo posee, se puede ver claramente la diferencia en el porcentaje de aceite recuperado. Según los resultados obtenidos en este estudio, no existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos (microondas y ultrasonido), pero si lo hay al no aplicarlos (cuadro VII).

Además, los resultados concuerdan con estudios que indican que los métodos de ruptura celular aplicados en la extracción de aceite de microalgas como el ultrasonido y las microondas, ayudan incrementando la cantidad de aceite obtenido sin afectar la composición de ácidos grasos<sup>10</sup>, es por esto que los resultados demuestran que el uso de microondas o ultrasonido puede llegar a ser una herramienta útil en los procesos de extracción, frente a métodos que no los utilizan.

Cuadro VII. Porcentaje de aceite obtenido por el método de B&D utilizando tratamientos de ruptura celular y el método sin tratamiento celular.

Tratamiento	Porcentaje de aceite extraído (%)
Microondas	3,5
Ultrasonido	3,30
Sin tratamiento	0,62

Como no hay una diferencia significativa entre los tratamientos de microondas y ultrasonido, se debe ver la practicidad de cada uno de ellos, por ejemplo, el uso de microondas es mucho más rápido que el de ultrasonido, mientras que un tratamiento de microondas puede durar 45 segundos, el método de ultrasonido para obtener el mismo efecto tarda hasta 20 minutos. Esto en términos de tiempo y energía indica que es más viable el método de microondas, si el proceso fuera a ser escalado o industrial.

## Composición de ácidos grasos presente en el aceite extraído de la microalga *Chlorella vulgaris*

Se caracterizó el aceite extraído de las microalgas para evaluar su calidad como potencial biocombustible. Se realizó un perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases para analizar la composición presente en el aceite de microalgas (figura 10, cuadro VIII, anexo 5).

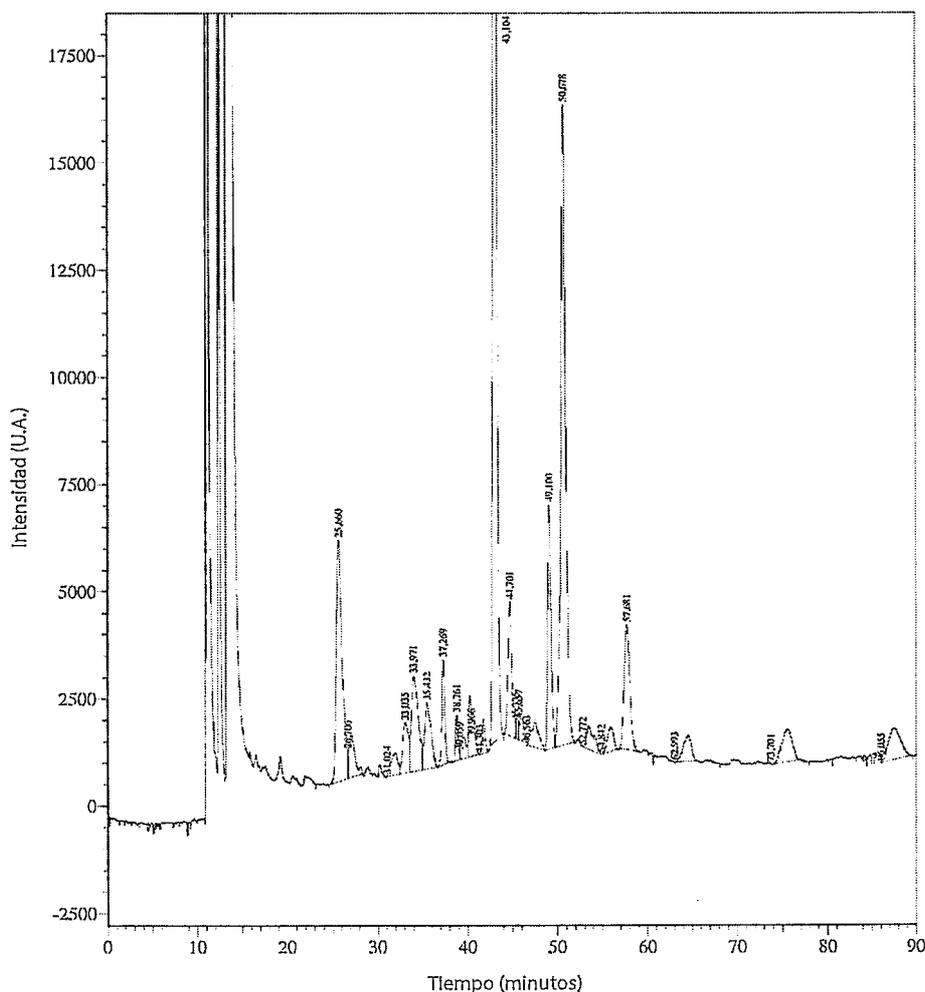


Figura 10. Cromatografía de gases para obtener el perfil de ácidos grasos presente en la muestra del aceite de la microalga *Chlorella vulgaris*

Cuadro VIII. Perfil de ácidos grasos para la muestra de aceite de la microalga *Chlorella vulgaris* y el índice de cetano reportado en la literatura.

Ácido graso	Composición	% Relativo
Láurico	12:0	0,97
Tridecanoico	13:0	4,08
Mirístico	14:0	1,89
Miristoleico	14:1	0,67
Pentadecanoico	15:0	1,83
Palmítico	16:0	32,00
Palmitoleico	16:1	3,35
Margárico	17:0	0,64
Esteárico	18:0	5,16
Oleico	18:1	18,99
Linoleico	18:2	1,12
cis-11-eicosenoico	20:1	4,51
Otros (no identificados)		24,79

Se puede observar que el porcentaje relativo de ácidos grasos insaturados en el aceite de microalgas es de 28,64 %, lo que sugiere que el estado físico del aceite extraído es sólido, lo cual no concuerda con lo obtenido experimentalmente, esto puede ser debido al porcentaje de ácidos grasos que no fueron identificados donde del 24,79 %, un 15,77 % corresponden a ácidos grasos de menos de 15 carbonos que se estima según el tiempo de retención obtenido, los cuales son líquidos a temperatura ambiente y es posible que parte de ese porcentaje sean ácidos grasos insaturados (figura 11, anexo 9).



**Figura 111.** Aceite extraído de la microalga *C. vulgaris*.

Si las condiciones de cultivo y extracción cambian, se ha observado en diversas publicaciones que el perfil de lípidos varía así como el contenido total de lípidos que va desde un 19 %<sup>24,29</sup> hasta un 25,4 %<sup>44</sup>. Se sabe que la producción de aceite y la composición de ácidos grasos es dependiente del metabolismo de la microalga<sup>45</sup> y que la técnica empleada para la cosecha es crucial para mantener los lípidos de la microalga (cuadro IX).

Cuadro IX. Composición de ácidos grasos en la microalga *C. vulgaris* bajo distintos métodos de extracción y cultivo.

Ácido graso	Composición	% Relativo <sup>46</sup>	% Relativo <sup>29</sup>	% Relativo <sup>24</sup>
Láurico	12:0	1,6	-	-
Mirfístico	14:0	1,1	2,10	7,16
Pentadecanoico	15:0	-	-	0,23
Palmítico	16:0	26,00	20,69	29,54
Palmitoleico	16:1	0,4	8,39	3,39
Margárico	17:0	2,5	-	0,33
Heptadecenoico	17:1	4,7	-	-
Esteárico	18:0	10,3	5,77	7,63
Oleico	18:1	17,9	-	-
Linoleico	18:2	15,4	35,72	36,07
Linolénico	18:3	12,5	1,15	11,22
Eicosanoico	20:0	-	-	0,94
Araquidónico	20:4	-	1,38	
Behénico	22:0	-	-	1,60
Lignocérico	24:0	-	-	3,02
Otros (no identificados)		7,5	24,81	-

En el presente estudio se utilizó agua residual como medio de cultivo el cual se ha demostrado en varios estudios que es un medio excelente para la producción de biomasa y acumulación de lípidos<sup>47</sup>, además de representar un ahorro significativo en fertilizantes. Las microalgas cosechadas no presentaron el contenido de lípidos esperado, esto se debe al tiempo de cosecha que debe ser menor, ya que las microalgas al encontrarse en una condición de estrés como la

disminución de un nutriente, por ejemplo nitrógeno, buscarán una fuente de energía disponible, en este caso los lípidos acumulados.

Se encontró que los ácidos grasos presentes en mayor proporción son C16:0 y el C18:1 con un 32,00 % y 18,99 % de abundancia respectivamente, seguido por C18:0 > C20:1 > C13:0.

Mathimani *et al.*<sup>48</sup> utiliza una mezcla de cloroformo: metanol de acuerdo con método de Bligh & Dyer que se usó para la presente investigación y reporta que el aceite extraído de la microalga *C. vulgaris* es apto para la producción de biodiesel.

## CONCLUSIONES

Se aplicaron dos tratamientos de ruptura celular, ultrasonido y microondas para determinar si hay diferencias significativas en la determinación del porcentaje de aceite extraído frente a métodos que no lo utilizan, y se concluye que no hay diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, sin embargo, si se compara contra los métodos que no utilizan microondas o ultrasonido sí hay una diferencia en el porcentaje de aceite obtenido, donde se observa que los procedimientos de extracción de aceite que no utilizan ruptura celular tienen un menor porcentaje de aceite recuperado con respecto a los que sí aplican un tratamiento.

La cantidad de aceite extraído por el método de Bligh & Dyer es mayor a la del método Soxhlet sin embargo, el aceite extraído debe ser tratado con carbón activado para eliminar la presencia de carotenoides y clorofila, lo que requiere un mayor tiempo de tratamiento que puede traducirse en un mayor costo de extracción si este fuera escalado.

La caracterización del aceite de microalgas de la cepa *C. vulgaris* por el método de cromatografía de gases, reveló su potencial uso como biocombustible.

Al determinar la entalpía de combustión del residuo de microalgas, se demostró la posibilidad de satisfacer demandas energéticas como combustible sólido, donde este residuo puede ser utilizado como materia prima para la generación de calor y potencia en la industria.

El contenido de proteína y fibra en la microalga demostró que puede ser utilizado en la industria alimentaria.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda estudiar el uso de las microalgas como tratamiento de aguas residuales, en el presente estudio se pudo observar que no tienen un impedimento en el crecimiento y es posible que sirva como material de biorremediación al haber encontrado magnetita dentro de la estructura de la microalga. De esta manera, se propone hacer un estudio ante diferentes concentraciones de metales pesados con problemática en el país, que indique su capacidad como biorremediador.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Barrantes, M. G. Desarrollan sistema integrado para la producción de microalgas acoplado a un biodigestor y a un emisor de CO<sub>2</sub>. *Investiga.TEC* 2014, 0 (19), 21.
- (2) Halim, R.; Danquah, M. K.; Webley, P. a. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol. Adv.* 2012, 30 (3), 709–732.
- (3) Iverson, S. J.; Lang, S. L.; Cooper, M. H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 2001, 36 (11), 1283–1287.
- (4) Wagner, L. Biodiesel from Algae Oil  
[http://www.fao.org/uploads/media/0707\\_Wagner\\_-\\_Biodiesel\\_from\\_algae\\_oil.pdf](http://www.fao.org/uploads/media/0707_Wagner_-_Biodiesel_from_algae_oil.pdf) (accessed sep 28, 2014).
- (5) Phukan, M. M.; Chutia, R. S.; Konwar, B. K.; Kataki, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. *Appl. Energy* 2011, 88 (10), 3307–3312.
- (6) Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 2007, 25 (3), 294–306.
- (7) Galindo Vega, L. D.; Gonzáles Muñoz, S. S. Adaptación del método de Bligh & Dyer a la extracción de lípidos de microalgas nativas para la producción de biodiesel, Universidad Industrial de Santander, 2010.
- (8) Li, Y.; Ghasemi Naghdi, F.; Garg, S.; Adarme-Vega, T. C.; Thurecht, K. J.; Ghafor, W. A.; Tannock, S.; Schenk, P. M. A comparative study: the impact

- of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microb. Cell Fact.* 2014, 13 (1), 14.
- (9) Lee, J.-Y.; Yoo, C.; Jun, S.-Y.; Ahn, C.-Y.; Oh, H.-M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.* 2010, 101 Suppl (1), S75-7.
- (10) Ma, Y.-A.; Cheng, Y.-M.; Huang, J.-W.; Jen, J.-F.; Huang, Y.-S.; Yu, C.-C. Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2014, 37 (8), 1543–1549.
- (11) Balasubramanian, S.; Allen, J. D.; Kanitkar, A.; Boldor, D. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system—design, optimization, and quality characterization. *Bioresour. Technol.* 2011, 102 (3), 3396–3403.
- (12) Mercer, P.; Armenta, R. E. Developments in oil extraction from microalgae. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011, 113 (5), 539–547.
- (13) Schwede, S.; Kowalczyk, A.; Gerber, M.; Span, R. Influence of Different Cell Disruption Techniques on Mono Digestion of Algal Biomass. En *World Renewable Energy Congress*; Linköping, Sweden, 2011; pp 41–47.
- (14) Bermúdez Menéndez, J. M.; Arenillas, A.; Menéndez Díaz, J. Á.; Boffa, L.; Mantegna, S.; Binello, A.; Cravotto, G. Optimization of microalgae oil extraction under ultrasound and microwave irradiation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2013, Núm. August, 1779–1784.
- (15) Khanal, S. K.; Montalbo, M.; van Leeuwen, J.; Srinivasan, G.; Grewell, D. Ultrasound enhanced glucose release from corn in ethanol plants. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 98 (5), 978–985.

- (16) Gerde, J. a; Montalbo-Lomboy, M.; Yao, L.; Grewell, D.; Wang, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresour. Technol.* 2012, 125, 175–181.
- (17) Montalbo-Lomboy, M.; Johnson, L.; Khanal, S. K.; van Leeuwen, J. H.; Grewell, D. Sonication of sugary-2 corn: a potential pretreatment to enhance sugar release. *Bioresour. Technol.* 2010, 101 (1), 351–358.
- (18) King P.M., N. K.; Joyce, E. M.; Mason, T. J. Ultrasonic disruption of algae cells. En *INTERNATIONAL CONGRESS ON ULTRASONICS: Gdańsk 2011*; AIP Publishing, 2012; Vol. 1433, pp 237–240.
- (19) Wang, G.; Wang, T. Lipid and Biomass Distribution and Recovery from Two Microalgae by Aqueous and Alcohol Processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2011, 89 (2), 335–345.
- (20) Monthieu, C. Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel, Universidad Pontificia Comillas, 2010.
- (21) Homogeneizadores Ultrasónicos para el Procesamiento de Líquidos <http://www.hielscher.com/es/ultrasonic-homogenizers-for-liquid-processing-3.htm> (accessed sep 29, 2014).
- (22) Rawat, I.; Ranjith Kumar, R.; Mutanda, T.; Bux, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl. Energy* 2011, 88 (10), 3411–3424.
- (23) Pragya, N.; Pandey, K. K.; Sahoo, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2013, 24, 159–171.

- (24) Kim, Y. H.; Choi, Y. K.; Park, J.; Lee, S.; Yang, Y. H.; Kim, H. J.; Park, T. J.; Hwan Kim, Y.; Lee, S. H. Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. *Bioresour. Technol.* **2012**, *109*, 312–315.
- (25) Oilgae <http://www.oilgae.com/algae/oil/extract/che/che.html> (accessed may 20, 2015).
- (26) Halim, R.; Gladman, B.; Danquah, M. K.; Webley, P. a. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102* (1), 178–185.
- (27) Adam, F.; Abert-Vian, M.; Peltier, G.; Chemat, F. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. *Bioresour. Technol.* **2012**, *114*, 457–465.
- (28) Salazar, L. E. Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel, Universidad de Piura, 2012.
- (29) Dos Santos, R. R.; Moreira, D. M.; Kunigami, C. N.; Aranda, D. A. G.; Teixeira, C. M. L. L. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrason. Sonochem.* **2015**, *22*, 95–99.
- (30) Daniels, F.; Mathews, J. H.; Williams, J. W.; Bender, P.; Alberty, R. A. *Experimental Physical Chemistry*, 5th ed.; McGraw-Hill Book Company, Inc: New York, 1956.
- (31) Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos. *Ácidos grasos saturados, insaturados, trans y omegas por CG.*; Costa Rica, 2016; pp 1–13.
- (32) Zheng, H.; Yin, J.; Gao, Z.; Huang, H.; Ji, X.; Dou, C. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of

- grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *164* (7), 1215–1224.
- (33) Florentino de Souza Silva, A. P.; Costa, M. C.; Colzi Lopes, A.; Fares Abdala Neto, E.; Carrhá Leitão, R.; Mota, C. R.; Bezerra dos Santos, A. Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae. *Renew. Energy* **2014**, *63*, 762–766.
- (34) Kalderis, D.; Kotti, M. S.; Méndez, A.; Gascó, G. Characterization of hydrochars produced by hydrothermal carbonization of rice husk. *Solid Earth* **2014**, *5*, 477–483.
- (35) Sandoval Salazar, J. Proyecto Eléctrico Potencial de aporte en generación eléctrica en Costa Rica por parte de los ingenios azucareros mediante biomasa, Universidad de Costa Rica, 2014.
- (36) Garcés Paz, R. V.; Martinez Silva, S. V. Estudio del poder calorífico del bagazo de caña de azúcar en la industria azucarera de la zona de Risaralda, Universidad Tecnológica de Pereira, 2007.
- (37) Mata Segreda, J.; Jiménez Gutierrez, M. Briquetas de palma africana [http://www.proinnova.co.cr/descargables/Briquetas\\_de\\_palma\\_africana.pdf](http://www.proinnova.co.cr/descargables/Briquetas_de_palma_africana.pdf) (accessed ene 1, 2016).
- (38) Gonçalves, A. L.; Rodrigues, C. M.; Pires, J. C. M.; Simões, M. The effect of increasing CO<sub>2</sub> concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria. *Algal Res.* **2016**, *14*, 127–136.
- (39) Vela García, F. N. Remoción de mercurio en aguas residuales de la actividad minera con el uso de microalgas, Universidad de las Américas,

2016.

- (40) Upadhyay, A. K.; Singh, N. K.; Singh, R.; Rai, U. N. Amelioration of arsenic toxicity in rice: Comparative effect of inoculation of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis* sp. on growth, biochemical changes and arsenic uptake. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, *124*, 68–73.
- (41) Liang, Y.; Sarkany, N.; Cui, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1043–1049.
- (42) Kholif, A. E.; Morsy, T. A.; Matloup, O. H.; Anele, U. Y.; Mohamed, A. G.; El-Sayed, A. B.; Abedi, E.; Sahari, M. A.; Kadegowda, A. K. G.; Bionaz, M.; et al. Dietary *Chlorella vulgaris* microalgae improves feed utilization, milk production and concentrations of conjugated linoleic acids in the milk of Damascus goats. *J. Agric. Sci.* **2016**, *2* (5), 1–11.
- (43) Ejike, C. E. C. C.; Collins, S. A.; Balasuriya, N.; Swanson, A. K.; Mason, B.; Udenigwe, C. C. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *59*, 30–36.
- (44) dos Santos, R. R.; Kunigami, C. N.; Gomes Aranda, D. A.; Luz Lapa Teixeira, C. M. Assessment of triacylglycerol content in *Chlorella vulgaris* cultivated in a two-stage process. *Biomass and Bioenergy* **2016**, *92*, 55–60.
- (45) Chen, C.-Y.; Yeh, K.-L.; Aisyah, R.; Lee, D.-J.; Chang, J.-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102* (1), 71–81.
- (46) Luque, L.; Orr, V. C. A.; Chen, S.; Westerhof, R.; Oudenhoven, S.; Rossum,

- G. van; Kersten, S.; Berruti, F.; Rehmman., L. Lipid accumulation from pinewood pyrolysates by *Rhodospiridium diobovatum* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **2016**, *214*, 660–669.
- (47) Lv, J.; Feng, J.; Liu, Q.; Xie, S. Microalgal Cultivation in Secondary Effluent: Recent Developments and Future Work. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (1), 79.
- (48) Mathimani, T.; Senthil Kumar, T.; Chandrasekar, M.; Uma, L.; Prabakaran, D. Assessment of fuel properties, engine performance and emission characteristics of outdoor grown marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 biodiesel. *Renew. Energy* **2017**, *105*, 637–646.

## ANEXOS

Anexo 1. Diseño factorial propuesto para el experimento utilizando microondas como pretratamiento.

Orden	Método	Tiempo (s)	Temperatura (° C)	Presión (atm)
1	Soxhlet	30	80	1
2	B&D	30	80	1
3	Soxhlet	45	80	1
4	B&D	45	80	1
5	Soxhlet	30	90	1
6	B&D	30	90	1
7	Soxhlet	45	90	1
8	B&D	45	90	1
9	Soxhlet	30	80	1,5
10	B&D	30	80	1,5
11	Soxhlet	45	80	1,5
12	B&D	45	80	1,5
13	Soxhlet	30	90	1,5
14	B&D	30	90	1,5
15	Soxhlet	45	90	1,5
16	B&D	45	90	1,5

Anexo 2. Diseño factorial propuesto para el experimento utilizando ultrasonido como pretratamiento.

Orden	Método	Tiempo (min)
1	B&D	10
2	Soxhlet	10
3	B&D	10
4	Soxhlet	10
5	B&D	20
6	Soxhlet	20
7	B&D	20
8	Soxhlet	20

Anexo 3. Arreglo factorial para determinar cuál tratamiento de ruptura celular microondas o ultrasonido es el óptimo en el porcentaje de extracción de aceite.

Factor	Nivel
Pretratamiento	Ultrasonido
	Microondas
Tiempo	10
	20
Método	Soxhlet
	B&D

**Anexo 4.** Determinación del poder calórico de la biomasa residual de microalgas por el método descrito por Daniels *et al.*<sup>30</sup>

**Cuadro X.** Datos obtenidos en la determinación del poder calórico de la biomasa residual de microalgas

Masa ácido benzoico 1	1,0098 g
Masa ácido benzoico 2	1,0003 g
Masa ácido benzoico 3	1,0146 g
$\Delta T$ ácido benzoico 1	2,519 K
$\Delta T$ ácido benzoico 2	2,488 K
$\Delta T$ ácido benzoico 3	2,622 K
$\Delta H$ combustión ácido benzoico	-6319,0 cal/g
$\Delta H$ combustión alambre de hierro	-2,3 cal/cm
Masa pastilla biomasa 1	1,1424 g
Masa pastilla biomasa 2	1,0347 g
Masa pastilla biomasa 3	1,0027 g
$\Delta T$ pastilla biomasa 1	1,197 K
$\Delta T$ pastilla biomasa 2	1,062 K
$\Delta T$ pastilla biomasa 3	1,034 K

Para obtener la capacidad calorífica del calorímetro y de la biomasa, se utiliza la primera ley de la termodinámica.

$$\Delta U = q - w \text{ [Ecuación 7]}$$

Donde  $\Delta U$  corresponde al cambio de energía interna del sistema,  $q$  es la transferencia de energía del sistema en forma de flujo de calor y  $w$  es el trabajo realizado por el sistema.

En este experimento a volumen constante,  $w$  puede despreciarse, además como dicho experimento se realiza bajo condiciones adiabáticas, el valor de  $q$  es igual al cero. Por lo tanto, de la ecuación 7 se puede concluir que:

$$\Delta U = 0 \text{ [Ecuación 8]}$$

Para que esto se cumpla, el calor perdido debe ser igual en magnitud al calor ganado.

$$-q_{\text{cedido}} = q_{\text{ganado}} \text{ [Ecuación 9]}$$

El valor de  $q_{\text{cedido}}$ , corresponde al cambio de energía interna total producto de la combustión del ácido benzoico con el alambre de hierro, en este caso se utilizan los valores reportados por la literatura<sup>30</sup> para el ácido benzoico ( $\Delta_{\text{comb.HBen}} = -6319 \text{ cal/g}$ ) y el reportado para el alambre según la casa fabricante ( $\Delta_{\text{comb.Fe}} = -2,3 \text{ cal/cm}$ ). El valor de  $q_{\text{ganado}}$  corresponde a la capacidad calórica del calorímetro y el agua; el cambio en la temperatura ( $\Delta T$ , K) medida al realizar la combustión, tal como se muestra en la ecuación 10. Los valores  $m_{\text{pastilla}}$  y  $l_{\text{alambre}}$  corresponden a la masa de la pastilla de ácido benzoico y a la longitud del alambre respectivamente.

$$-(\Delta_{\text{comb.past}} U \cdot m_{\text{pastilla}} + \Delta_{\text{comb.alambre}} U \cdot l_{\text{alambre}}) = C \Delta T \text{ [Ecuación 10]}$$

Sustituyendo los valores se tiene que:

$$-\left(-6319,0 \frac{\text{cal}}{\text{g}} * 1,0003 \text{ g} - 2,3 \frac{\text{cal}}{\text{cm}} * 6,30 \text{ cm}\right) = C * 2,488 \text{ K}$$

$$C = 2546,38 \frac{\text{cal}}{\text{K}} * \frac{4,1855 \text{ J}}{1 \text{ cal}} * \frac{1 \text{ KJ}}{1000 \text{ J}} = 10,66 \pm 0,02 \text{ kJ/K}$$

$$C_1 = 10,63 \pm 0,02 \frac{\text{kJ}}{\text{K}}$$

$$C_3 = 10,26 \pm 0,02 \frac{\text{kJ}}{\text{K}}$$

Para obtener valor de la capacidad solamente del calorímetro ( $C_0$ ) se utiliza la siguiente fórmula:

$$C_0 = C - (m_{\text{H}_2\text{O}} \cdot C_{\text{H}_2\text{O}}) \quad \text{[Ecuación 11]}$$

Donde  $m_{\text{H}_2\text{O}}$  es la cantidad de agua que se vertió en el tanque metálico en gramos y  $C_{\text{H}_2\text{O}}$  es la capacidad calorífica del agua a 20 °C, la cual es de 4,1818 J/ K g.

Entonces para la ecuación 11 se tiene que:

$$C_0 = 10,6579 \frac{\text{kJ}}{\text{K}} - \left( 2000,00 \text{ mL} * \frac{0,99821 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \right) \cdot 4,1818 \times 10^{-3} \frac{\text{kJ}}{\text{K} * \text{g}}$$

$$C_0 = 2,3092 \frac{\text{kJ}}{\text{K}}$$

Finalmente para la obtención del  $\Delta_{\text{Comb.Biomasa}U}$  se utiliza la ecuación 10 y se despeja el término  $\Delta_{\text{Comb.pastilla}U}$ , dando la siguiente ecuación.

$$\left( \frac{C\Delta T - \Delta_{\text{comb.Fe}} \cdot l_{\text{Fe}}}{m_{\text{pastilla}}} \right) = \Delta_{\text{comb.Biomasa}U} \quad \text{[Ecuación 12]}$$

Donde C es el valor de la capacidad calorífica del calorímetro (kJ/ K, calorímetro y agua). El significado de cada variable es el mismo que los de la ecuación 10.

Entonces para la mediana de las mediciones de la biomasa residual de microalgas se tiene que:

$$\left( \frac{10,6579 \frac{kJ}{K} * 1,197 K + 14,49 cal * \frac{4,1855 \times 10^{-3} kJ}{1 cal}}{1,1424 g} \right) = \Delta_{combBiomasa} U$$

$$\Delta_{combBiomasa} U_1 = 11,2 \pm 0,2 \text{ MJ/kg}$$

$$\Delta_{combBiomasa} U_2 = 11,0 \pm 0,2 \text{ MJ/kg}$$

$$\Delta_{combBiomasa} U_3 = 11,1 \pm 0,2 \text{ MJ/kg (mediana)}$$

Anexo 5. Tiempos de retención y área de los picos obtenidos mediante cromatografía de gases para los ácidos grasos presentes en la muestra de aceite de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Ácido graso	Tiempo de retención (min)	Área del pico (mV·s)	% relativo
Desconocido	25,660	256130	8,90
Desconocido	26,706	45606,3	1,59
Laurico	31,024	28033,3	0,97
Desconocido	33,035	53363	1,86
Tridecanoico	33,971	117313,2	4,08
Desconocido	35,432	76962,9	2,68
Mirístico	37,269	54375	1,89
Desconocido	38,761	21286,2	0,74
Miristoleico	39,059	19323,6	0,67
Pentadecanoico	39,966	52511,6	1,83
Desconocido	41,303	18554,2	0,65
Palmitico	43,104	920516,8	32,00
Palmitoleico	44,701	96423,1	3,35
Desconocido	45,335	9894,2	0,34
Margarico	45,657	18472,3	0,64
Desconocido	46,563	34100,9	1,19
Estearico	49,100	148391,2	5,16
Oleico	50,678	546316,5	18,99
Linoleico	52,772	32167,4	1,12
Desconocido	54,842	26925,8	0,94
cis-11-eicosenoico	57,681	129673,5	4,51
Desconocido	62,993	37271,7	1,30
Desconocido	73,701	60200,4	2,09
Desconocido	86,055	72741	2,53